

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-356437

(43)Date of publication of application : 13.12.2002

(51)Int.Cl.

A61K 38/00
A61K 67/027
A61K 31/711
A61K 45/00
A61K 48/00
A61P 19/00
A61P 19/02
A61P 19/08
A61P 19/10
A61P 43/00
C12N 5/06
C12N 15/09
C12Q 1/02
C12Q 1/68
G01N 33/15
G01N 33/50
G01N 33/53
G01N 33/566
// C07K 14/47

(21)Application number : 2001-235851

(71)Applicant : TAKEDA CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 03.08.2001

(72)Inventor : HIKICHI YUICHI

(30)Priority

Priority number : 2000242767 Priority date : 04.08.2000 Priority country : JP

(54) USE OF GLI1 GENE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a use of Gli1 gene.

SOLUTION: A screening method using a cell capable of expressing Gli1 gene can be used for the search of a compound or its salt having an activity to control the expression of Gli1 gene. A compound having an activity to promote the expression of Gli1 gene has a bone or cartilage inducing activity and, accordingly, it can be used as an agent for preventing and treating diseases of orthopedic field, diseases of dental surgery field and osteoporosis, etc. It is further usable as a treating agent for bone grafting in cosmetic surgery field and a differentiation inducing agent for autotransplantation in regeneration medicine. A compound active to inhibit the expression of Gli1 gene can be used e.g. as a preventing and treating agent for hyperosteogenesis or hyperchondrogenesis.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-356437

(P2002-356437A)

(43) 公開日 平成14年12月13日 (2002.12.13)

(51) Int. Cl.	識別記号	P I	キーワード (参考)
A 6 1 K 38/00		A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 31/711	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/711		45/00	4 B 0 6 3
45/00		48/00	4 B 0 6 6
48/00		A 6 1 P 19/00	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 請求項の数51 O L (全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-235851 (P2001-235851)	(71) 出願人	000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(22) 出願日	平成12年8月3日 (2001.8.3)	(72) 発明者	引地 裕一 茨城県つくば市松代4丁目21番2 シャレールつくば松代1号棟504号
(31) 優先権主張番号	特願2000-242767 (P2000-242767)	(74) 代理人	100003676 弁理士 小林 純子 (外3名)
(32) 優先日	平成12年8月4日 (2000.8.4)		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 G I I I 遺伝子の用途

(57) 【要約】

【課題】 G I I I 遺伝子の用途の提供。

【効果】 本発明の G I I I 遺伝子を発現する能力を有する細胞を用いたスクリーニング方法は、G I I I 遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩の探索に用いることができる。G I I I 遺伝子の発現を促進する活性を有する化合物は骨、あるいは軟骨誘導活性を有するため、整形外科領域の疾患、または歯科領域の疾患、さらには骨粗鬆症などの予防・治療剤として用いることができる。また、美容外科領域における骨移植の治療剤としても用いることができるし、再生医療における自家移植の際の分化誘導剤としても利用できる。一方、G I I I 遺伝子の発現を阻害する活性を有する化合物は、例えば骨・軟骨形成過剰症の予防・治療剤として用いることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 G111タンパク質、その部分ペプチドまたはその塩を含有する骨・軟骨分化誘導剤。

【請求項2】 G111タンパク質が配列番号：10、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15または配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質である請求項1記載の剤。

【請求項3】 G111タンパク質が配列番号：10、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15または配列番号：17で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質である請求項1記載の剤。

【請求項4】 G111タンパク質、その部分ペプチドまたはその塩を含有する骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再建剤または骨移植治療剤。

【請求項5】 G111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有する骨・軟骨分化誘導剤。

【請求項6】 DNAが配列番号：9、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16または配列番号：18で表される塩基配列を含有する請求項5記載の剤。

【請求項7】 G111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有する組換えベクターを含有する請求項5記載の剤。

【請求項8】 G111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有する骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再建剤または骨移植治療剤。

【請求項9】 G111タンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨・軟骨分化誘導方法。

【請求項10】 G111タンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療方法。

【請求項11】 骨・軟骨分化誘導剤を製造するためのG111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の使用。

【請求項12】 骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再建剤または骨移植治療剤を製造するためのG111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の使用。

【請求項13】 G111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨・軟骨分化誘導方法。

【請求項14】 G111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療方法。

【請求項15】 骨・軟骨分化誘導剤を製造するためのG111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの使用。

【請求項16】 骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再建剤または骨移植治療剤を製造するためのG111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの使用。

【請求項17】 配列番号：10、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15または配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列を含有するアンチセンスDNAを含有する骨・軟骨分化阻害剤。

【請求項18】 配列番号：10、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15または配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列を含有するアンチセンスDNAを含有する骨・軟骨形成過剰症の予防・治療剤。

【請求項19】 配列番号：10、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15または配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA、または該DNAの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列を含有するアンチセンスDNAを含有する骨・軟骨疾患の診断剤。

【請求項20】 配列番号：10、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15または配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA、または該DNAの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列を含有するアンチセンスDNAを用いることを特徴とする骨・軟骨疾患の診断方法。

【請求項21】 G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の抗体を含有する骨・軟骨疾患の診断剤。

【請求項22】 G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の抗体を用いることを特徴とする骨・軟骨疾患の診断方法。

【請求項23】 G111タンパク質、その部分ペプチ

ドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする骨・軟骨分化調節作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項24】 G111タンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する細胞を用いることを特徴とする請求項23記載のスクリーニング方法。

【請求項25】 G111タンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、軟骨分化のマーカー遺伝子の発現量を測定することを特徴とする請求項23記載のスクリーニング方法。

【請求項26】 軟骨分化のマーカー遺伝子がI型Bコラーゲン遺伝子である請求項25記載のスクリーニング方法。

【請求項27】 G111タンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、細胞の軟骨分化状態を観察することを特徴とする請求項23記載のスクリーニング方法。

【請求項28】 G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とする骨・軟骨分化調節作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項29】 請求項23～27記載のスクリーニング方法、または請求項28記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、骨・軟骨分化調節作用を有する化合物またはその塩。

【請求項30】 請求項29記載の化合物またはその塩を含有する骨・軟骨分化調節剤。

【請求項31】 請求項29記載の化合物またはその塩を含有する骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症、骨粗鬆症または骨・軟骨形成過剰症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再建剤または骨移植治療剤。

【請求項32】 請求項29記載の化合物またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨・軟骨疾患の予防・治療方法。

【請求項33】 請求項29記載の化合物またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症、骨粗鬆症または骨・軟骨形成過剰症の予防・治療方法。

【請求項34】 骨・軟骨疾患の予防・治療剤を製造するための請求項29記載の化合物またはその塩の使用。

【請求項35】 骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症、骨粗鬆症または骨・軟骨形成過剰症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再建剤または骨移植治療剤を製造するための請求項29記載の化合物またはその塩の使用。

【請求項36】 G111タンパク質、その部分ペプチ

ドまたはその塩の作用を増強または活性化することを特徴とする骨・軟骨分化誘導方法。

【請求項37】 G111タンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の作用を増強または活性化することを特徴とする骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療方法。

【請求項38】 G111遺伝子を発現する能力を有する細胞を用いることを特徴とするG111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項39】 G111遺伝子を発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、G111遺伝子DNAもしくはその相補DNAまたはその部分DNAを用いてそれぞれのG111タンパク質をコードするmRNAの量を測定することを特徴とする請求項38記載のスクリーニング方法。

【請求項40】 G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーをレポーター遺伝子に連結させたDNAで形質転換した細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、それぞれの該レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とするG111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項41】 G111遺伝子を発現する能力を有する細胞が骨または軟骨への分化能を有する細胞あるいは既に分化形態を示している細胞である請求項38記載のスクリーニング方法。

【請求項42】 G111遺伝子を発現する能力を有する細胞を含有することを特徴とするG111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項43】 G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーをレポーター遺伝子に連結させたDNAで形質転換した細胞を含有することを特徴とするG111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項44】 請求項38記載のスクリーニング方法、または請求項42記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、G111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩（但し、G113遺伝子またはその産物を除く）。

【請求項45】 請求項40記載のスクリーニング方法、または請求項43記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化合物またはその塩。

【請求項46】 請求項44または45記載の化合物またはその塩を含有する医薬。

【請求項47】 請求項44または45記載の化合物またはその塩を含有する骨・軟骨疾患の予防・治療剤。

【請求項48】 請求項44または45記載の化合物またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨・軟骨疾患の予防・治療方法。

【請求項49】 骨・軟骨疾患の予防・治療剤を製造するための請求項44または45記載の化合物またはその塩の使用。

【請求項50】 G111遺伝子の発現を増強または活性化することを特徴とする骨・軟骨分化誘導方法。

【請求項51】 G111遺伝子の発現を増強または活性化することを特徴とする骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明はG111遺伝子を発現する能力を有する細胞を用いたG111遺伝子の発現を制御（促進または阻害）する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング方法を用いて得られうる化合物またはその塩、および該化合物の用途に関する。

【0002】

【従来の技術】 グリア芽腫遺伝子（G111、G112およびG113）のうち、G111遺伝子の産物であるG111タンパク質はzinc fingerを有する転写因子に属し、ショウジョウバエの転写因子C1（Cubitus interruptus）の脊椎動物におけるホモログとされている（Aza-Blanc, P. et al., Trends Genet. (1999) 15, 458-462）。ショウジョウバエC1の機能については研究が進んでおり、C1が誘導する分子などが報告されている（McMahon, A.P. et al., Cell (2000) 100, 185-188）。G111タンパク質については、3種のG111タンパク質すべてがzinc finger領域を介して共通な配列に結合すること、G113タンパク質が直接G111遺伝子に含まれるプロモーター領域に結合し、その転写を誘導していることなどが報告されているが、G111タンパク質の機能はショウジョウバエのC1タンパク質の機能からの類推が主となっており、誘導分子などについても未知の点が多い。一方、G111遺伝子発現はヘッジホッグ（hedgehog）と呼ばれる可溶性分泌タンパク質によるシグナル伝達によって誘導されるとされている

（Dai, P. et al., J. Biol. Chem. (1999) 274, 8143-8152）。ヘッジホッグファミリーは昆虫から脊椎動物までを含む多くの動物種における形態形成の鍵として注目されている一群のタンパク因子であり、例えばSonic hedgehogの活性部位であるN末端ドメインを過剰発現させた繊維芽細胞をスー・マウスに移植すると異所性骨形成が誘導されることが報告されている（Kinto, R. et al., PDBS Lett. (1997) 404, 319-323）。これらの点で

ヘッジホッグタンパク質は様々な骨・軟骨障害、骨・軟骨疾患の治療、予防に有効と考えられるが、天然には微量にしか存在せず、治療に使用するべく大量に入手するためには組み換え型タンパク質を生産する必要がある。一般的に組み換え型タンパク質の生産は低分子化合物の生産よりはるかに多くの費用を要し、またタンパク質という特性から、医薬品としての物性、投与方法にも制約がある。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 骨・軟骨組織は未分化間葉系細胞等の多分化能を有する細胞の骨・軟骨前駆細胞への分化決定の後、骨・軟骨細胞への分化、増殖、骨・軟骨基質の合成といった一連の過程を経て形成される。胎生期や骨折治癒などの骨形成過程においては一般に軟骨分化が骨形成に先立って起こることから、軟骨分化促進は骨分化促進にもつながる。障害を受けた骨・軟骨組織の修復や誘導を要する疾患、あるいは過形成が問題となっている疾患はこれらのいずれかの過程が破綻していると考えられるが、これらを治癒に向わせる安価で、効果的な優れた医薬品の創製が切望されていた。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意検討した結果、G111の機能解析研究においてG111を過剰発現させると、軟骨マーカーの発現が亢進することを見出し、さらには例えばScleraxisなどのヘッジホッグシグナルに関与するとの報告がない転写因子の遺伝子を過剰発現させることによってもG111誘導は可能であることなどからヘッジホッグタンパク質を用いなくともG111発現の制御が可能であることを見出した。さらにヘッジホッグレセプターに直接作用するものではない一部の既存低分子化合物がG111の発現を誘導し、ひいては軟骨マーカー遺伝子の発現をも誘導することを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0005】 すなわち、本発明は

（1）G111タンパク質、その部分ペプチドまたはその塩を含有する骨・軟骨分化誘導剤、（2）G111タンパク質が配列番号：10、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15または配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質である前記（1）記載の剤、（3）G111タンパク質が配列番号：10、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15または配列番号：17で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩を含有する骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再生剤または骨移植治療

剤、(5) G111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有する骨・軟骨分化誘導剤、

(6) DNAが配列番号：9、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16または配列番号：18で表される塩基配列を含有する前記(5)記載の剤、(7) G111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有する組織欠陥部を含有する前記(5)記載の剤、(8) G111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有する骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再建剤または骨移植治療剤、(9) G111タンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨・軟骨分化誘導方法、(10) G111タンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療方法、(11) 骨・軟骨分化誘導剤を製造するためのG111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の使用、(12) 骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再建剤または骨移植治療剤を製造するためのG111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の使用、(13) G111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨・軟骨分化誘導方法、(14) G111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療方法、(15) 骨・軟骨分化誘導剤を製造するためのG111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの使用、(16) 骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再建剤または骨移植治療剤を製造するためのG111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの使用、(17) 配列番号：10、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15または配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列を含有するアンチセンスDNAを含有する骨・軟骨分化阻害剤、(18) 配列番号：10、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15または配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDN

A、または該DNAの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列を含有するアンチセンスDNAを含有する骨・軟骨形成過剰症の予防・治療剤、(19) 配列番号：10、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15または配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列を含有するアンチセンスDNAを含有する骨・軟骨疾患の診断剤、(20) 配列番号：10、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15または配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA、または該DNAの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列を含有するアンチセンスDNAを用いることを特徴とする骨・軟骨疾患の診断方法、(21) G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の抗体を含有する骨・軟骨疾患の診断剤、(22) G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の抗体を用いることを特徴とする骨・軟骨疾患の診断方法、(23) G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする骨・軟骨分化調節作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(24) G111タンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する細胞を用いることを特徴とする前記(23)記載のスクリーニング方法、(25) G111タンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、軟骨分化のマーカー遺伝子の発現量を測定することを特徴とする前記(23)記載のスクリーニング方法、(26) 軟骨分化のマーカー遺伝子がI型Bコラーゲン遺伝子である前記(25)記載のスクリーニング方法、(27) G111タンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、細胞の軟骨分化状態を観察することを特徴とする前記(23)記載のスクリーニング方法、(28) G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とする骨・軟骨分化調節作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、(29) 前記(23)～(27)記載のスクリーニング方法、または前記(28)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、骨・軟骨分化調節作用を有する化合物またはその塩、(30) 前記(29)記載の化合物またはその塩を含有する骨・軟骨分化調節剤、(31) 前記(29)記載の化合物またはその塩を含有する骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症、骨粗鬆症または骨・軟骨形成過剰症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再建剤または骨移植治療剤、(32) 前記(29)記載

の化合物またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨・軟骨疾患の予防・治療方法、(33)前記(29)記載の化合物またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症、骨粗鬆症または骨・軟骨形成過剰症の予防・治療方法、(34)骨・軟骨疾患の予防・治療剤を製造するための前記(29)記載の化合物またはその塩の使用、(35)骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症、骨粗鬆症または骨・軟骨形成過剰症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再建剤または骨移植治療剤を製造するための前記(29)記載の化合物またはその塩の使用、(36)G111タンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の作用を増強または活性化することを特徴とする骨・軟骨分化誘導方法、(37)G111タンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の作用を増強または活性化することを特徴とする骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療方法、(38)G111遺伝子を発現する能力を有する細胞を用いることを特徴とするG111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(39)G111遺伝子を発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、G111遺伝子DNAもしくはその相補DNAまたはその部分DNAを用いてそれぞれのG111タンパク質をコードするmRNAの量を測定することを特徴とする前記(38)記載のスクリーニング方法、(40)G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーをレポーター遺伝子に連結させたDNAで形質転換した細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、それぞれの該レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とするG111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(41)G111遺伝子を発現する能力を有する細胞が骨または軟骨への分化能を有する細胞あるいは既に分化形態を示している細胞である前記(38)記載のスクリーニング方法、(42)G111遺伝子を発現する能力を有する細胞を含有することを特徴とするG111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、(43)G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーをレポーター遺伝子に連結させたDNAで形質転換した細胞を含有することを特徴とするG111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、(44)前記(38)記載のスクリーニング方法、または前記(42)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、G111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩(但し、配列番

号:20または配列番号:22で表されるG113遺伝子またはその産物(配列番号:19または配列番号:21)を除く)、(45)前記(40)記載のスクリーニング方法、または前記(43)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化合物またはその塩、(46)前記(44)または(45)記載の化合物またはその塩を含有する医薬、(47)前記(44)または(45)記載の化合物またはその塩を含有する骨・軟骨疾患の予防・治療剤、(48)前記(44)または(45)記載の化合物またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨・軟骨疾患の予防・治療方法、(49)骨・軟骨疾患の予防・治療剤を製造するための前記(44)または(45)記載の化合物またはその塩の使用、(50)G111遺伝子の発現を増強または活性化することを特徴とする骨・軟骨分化誘導方法、(51)G111遺伝子の発現を増強または活性化することを特徴とする骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療方法などを提供する。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明においてG111遺伝子とはSasaki et al. Development (1998) 129, 3915-3924、Kinzler, KW. et al., Science (1987) 236, 70-73などに記載されている公知の遺伝子であり、マウスの遺伝子はAF026305、AB025922、ヒトの遺伝子はX07384としてGenBankに各々対応するアミノ酸配列とともに登録されている。また、G111遺伝子の多型についての研究がなされ、配列番号:14、16および18(対応するアミノ酸配列はそれぞれ配列番号:13、15および17)で表される、ヒトG111遺伝子上に3箇所の塩基置換が存在していることが報告されている(J. Invest. Dermatol. (2000) 115, 328-329)。本発明において「G111タンパク質」としては、配列番号:10、11、13、15または17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質を挙げることができる。G111タンパク質は、例えば、温血動物(例えば、ヒト、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サル等)のあらゆる細胞(例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、肝臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、筋芽細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨噬球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など)や血球系の細胞、

またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織。例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、脳頭核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳梁、黒質）、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睪丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であつてもよく、また合成タンパク質であつてもよい。なかでも温血動物（例えば、ヒト、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サル等）の細胞（例えば、グリア細胞、骨髄細胞、表皮細胞、繊維芽細胞、筋芽細胞、軟骨細胞、骨細胞もしくは骨芽細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞等）などに由来するタンパク質が好ましく用いられる。

【0007】配列番号：10、11、13、15または17で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：10、11、13、15または17で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、なかでも好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。本発明の配列番号：10、11、13、15または17で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：10、11、13、15または17で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：10、11、13、15または17で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。実質的に同質の活性としては、例えば、転写活性や骨・軟骨分化誘導作用などが挙げられる。実質的に同質とは、転写活性や骨・軟骨分化誘導作用が性質的に同質であることを示す。したがって、転写活性や骨・軟骨分化誘導作用が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度やタンパク質の分子量などの量的要素は異なつてもよい。骨・軟骨分化誘導作用などの活性の測定は、公知の方法に準じて行うことができるが、例えば、後に記載するスクリーニング方法に従つて測定することができる。転写活性の測定は公知の方法、例えばレポーターアッセイやRT-PCRなどの方法を用いて行うことができる。

【0008】また、本発明で用いられるG111タンパク質としては、①配列番号：10、11、13、15または17で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1

～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：10、11、13、15または17で表わされるアミノ酸配列中に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：10、11、13、15または17で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを含めたアミノ酸配列を含有するタンパク質なども用いられる。

【0009】本明細書におけるG111タンパク質は、ペプチド表記の慣例に従つて、左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：10、11、13、15または17で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明のG111タンパク質は、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであつてもよい。ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC₁₋₄アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₅₋₆シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどのC₆₋₁₀アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C₁₋₂アルキル基などのC₁₋₁₀アルキル基のほか、経口用エステルとして用いられるジバコイルオキシメチル基などが用いられる。本発明におけるG111タンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明におけるG111タンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。さらに、本発明におけるG111タンパク質には、上記したタンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₁₋₂アルカノイル基などのC₁₋₂アルキル基など）で保護されているもの、N末端が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₁₋₂アルカノイル基などのC₁₋₂アルキル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。本発明におけるG111タンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：

10、11、13、15または17で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質などが用いられる。

【0010】本発明におけるG111タンパク質の部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある）としては、上記したG111タンパク質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよい。本発明における部分ペプチドのアミノ酸の数は、上記したG111タンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を含有するペプチドなどが好ましい。実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、なかでも好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。ここで、「実質的に同質の活性」とは、上記と同義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は上記と同様に行うことができる。

【0011】また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1〜10個程度、さらに好ましくは数個（1〜5個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1〜20個程度、より好ましくは1〜10個程度、さらに好ましくは数個（1〜5個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1〜10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1〜5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。また、本発明の部分ペプチドはC末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。さらに、本発明の部分ペプチドには、上記した本発明のG111タンパク質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N末端が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。本発明のG111タンパク質またはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0012】本発明におけるG111タンパク質またはその塩は、上記した哺乳動物の細胞または組織から公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできる

し、後に記載する本発明のG111タンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後に記載するタンパク質合成法またはこれに準じて製造することもできる。哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行い、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせるにより精製分離することができる。

【0013】本発明におけるG111タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-（2', 4'-ジメトキシフェニル）ヒドロキシメチル）フェノキシ樹脂、4-（2', 4'-ジメトキシフェニル）フェノキシ樹脂などを挙げるることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質またはそのアミド体を取得する。上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt、HOBT）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するか、または、対応無水物またはHOBtエステルあるいはHOBTエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

【0014】保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用することが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいは

これらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 -20°C ～ 50°C の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することが

【0015】原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、C1-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化

(例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化)、アラルキルエステル化(例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化)、フェニルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、C1-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホン、DNP、ベンジルオキシメチル、Bom、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

【0016】原料のカルボキシ基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル(アルコール(例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,6-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N

-ヒドロキシフタルイミド、HOBt)とのエステルなどが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。保護基の除去(脱離)方法としては、例えば、Pd-塩あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ジペリジン、ジペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 -20°C ～ 40°C の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕獲剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリブトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

【0017】原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。タンパク質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシ基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド(タンパク質)鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質とC末端のカルボキシ基の保護基のみを除去したタンパク質とを製造し、この両タンパク質を上記したような混合溶液中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質を得ることができる。この粗タンパク質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要成分を凍結乾燥することで所望のタンパク質のアミド体を得ることができる。タンパク質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシ基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質のアミド体と同様にして、所望のタンパク質のエステル体を得ることができる。

【0018】本発明におけるG1；1タンパク質の部分ペプチドまたはその塩は、公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明におけるG1；1タンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造すること

ができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

- ①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publisher 10 s, New York (1966年)
- ②Schroeder および Luebk, ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)
- ③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)
- ④矢島治明 および 榎原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)
- ⑤矢島治明監修、経路薬品の開発 第4巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製分離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0019】本発明におけるG111タンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、上記した本発明におけるG111タンパク質をコードする塩基配列 (DNA またはRNA、好ましくはDNA) を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明におけるG111タンパク質をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖 (すなわち、コード鎖) であっても、アンチセンス鎖 (すなわち、非コード鎖) であってもよい。本発明におけるG111タンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997 記載の公知の方法またはそれに準じた方法により、G111タンパク質のmRNAを定量することができる。G111タンパク質をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりtotal RNAまた

はmRNA兩分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase ChainReaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。具体的には、G111タンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号: 9、13、14、16または18で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号: 9、12、14、16または18で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のG111タンパク質と実質的に同様の活性 (例、転写活性や骨・軟骨分化誘導作用など) を有するG111タンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。配列番号: 9、12、14、16または18で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号: 9、12、14、16または18で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

【0020】ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行うことができる。該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40mM、好ましくは約19~20mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。より具体的には、配列番号: 10で表わされるアミノ酸配列を含有するG111タンパク質をコードするDNAとしては、配列番号: 9で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。配列番号: 11で表わされるアミノ酸配列を含有するG111タンパク質をコードするDNAとしては、配列番号: 12で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。配列番号: 13で表わされるアミノ酸配列を含有するG111タンパク質をコードするDNAとしては、配列番号: 14で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。配列番号: 15で表わされるアミノ酸配列を含有するG111タンパク質をコードするDNAとしては、配列番号: 16で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。配列番号: 17で表わされるアミノ酸配列を含有するG111タンパク質をコードするDNAとしては、配列番号: 18で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。本発明におけるG111タンパク質をコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な

塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記の本発明の部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけでなく、RNAをも包含する意味で用いられる。本発明に従えば、G111タンパク質遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいは決定されたG111タンパク質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたポリヌクレオチド（核酸）は、G111タンパク質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいはG111タンパク質関連RNAとの相互作用を介してG111タンパク質遺伝子の発現を調節・制御することができる。G111タンパク質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、およびG111タンパク質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外でG111タンパク質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また癌などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド（タンパク質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される指令にあるペプチド（タンパク質）のアミノ酸を通常指している。G111タンパク質遺伝子の5' 端ヘアピンループ、5' 端6-ベースペア・リビート、5' 端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、翻訳終止コドン、3' 端非翻訳領域、3' 端パリンドローム領域、および3' 端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、G111タンパク質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

【0021】目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係、即ち対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということが出来る。アンチセンス・ポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特異的な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、二本鎖DNA、一本鎖DNA、二本鎖RNA、一本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さ

らに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キヤップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類似物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または金属含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えばタンパク質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-リジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α -アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオチド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいてよい。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

【0022】本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオチドアミドやオリゴヌクレオチドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., *Pharm Tech Japan*, Vol. 8, pp.247, 1992; Vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., *Antisense Research and Application*, CRC Press, 1993などに開示がある。本発明のアンチセンス核酸は、変性せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リボソーム、ミクロソームのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療

により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピッド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルタクロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内スクレオンド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのスクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた核酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。アンチセンス核酸の阻害活性は、G111遺伝子またはG111遺伝子を含む組換えベクターを含む形質転換体、生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいはG111タンパク質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸は公知の各種の方法で細胞に適用できる。

【0023】本発明における部分ペプチドをコードするDNAとしては、上記した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりmRNA断片を調製したものをを用いて直接

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、（1）配列番号：9、12、14、16または18で表わされる塩基配列を含有するDNAの部分塩基配列を含有するDNA、または（2）配列番号：9、12、14、16または18で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のG111タンパク質と実質的に同質の活性（例、転写活性や骨・軟骨分化誘導作用など）を有するG111タンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。より具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、（1）配列番号：9、12、14、16または1

8で表わされる塩基配列を含有するDNAの部分塩基配列を含有するDNA、または（2）配列番号：9、12、14、16または18で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明におけるG111タンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。配列番号：9、12、14、16または18で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：9、12、14、16または18で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。また、配列番号：9、12、14、16または18で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：9、12、14、16または18で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

【0024】本発明におけるG111タンパク質またはその部分ペプチド（以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のタンパク質の部分塩基配列を含有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

【0025】DNAの塩基配列の置換は、PCRや公知のキット、例えば、MutanTM-superExpress Km（宝酒造）、MutanTM-K（宝酒造）等を用いて、OlaTM-LA PCR法、gapped duplex法、Rimkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行うことができる。クローニングされた本発明のタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、

(イ) 本発明のタンパク質をコードするDNAを含む、例えばcDNAから目的とするDNA断片を切り出し、

(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

【0026】ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pCR4、pCR2.1、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pCDNA1/Neoなどが用いられる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられ、これらのうち、CMVプロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λP₁プロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

【0027】発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子(メソトレキセート(MTX)耐性)、アンピシリン耐性遺伝子(以下、Amp^rと略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子(以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性)等が挙げられる。特に、CHO(dhfr⁻)細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN末端側に付加する。

宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、α-アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母で

ある場合は、MFα・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、α-インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

【0028】宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ(Escherichia coli) K12-DH1[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103[スクイレック・アシックス・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221[ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology), 120巻, 517(1978)], HB101[ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600[ジェネティクス(Genetics), 39巻, 440(1954)], DH5α[Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H., Gene, 96, 23-28(1990)], DH10B[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 87巻, 4645-4649(1990)]などが用いられる。バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチリス(Bacillus subtilis) M1114[ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21[ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)]などが用いられる。酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, シンサッカロマイセス・ボンベ(Schizosaccharomyces pombe) NCYC1913, NCYC2036, ピキア・パストリス(Pichia pastoris)などが用いられる。

【0029】昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞(Spodoptera frugiperda cell; Sf細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh FiveTM細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmene acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞(Bombyx mori; BmN細胞)などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞(ATCC CRL1711)、Sf21細胞(以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ(In Vivo), 13, 213-217, (1977))などが用いられる。昆虫とし

ては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔節田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)〕。動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr⁻)細胞と略記)、マウスL細胞、マウスA:T-20、マウスミエロマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが用いられる。

【0030】エンシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行うことができる。バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行うことができる。酵母を形質転換するには、例えば、メソッド・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行うことができる。昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行うことができる。動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8細胞工学実験プロトコール, 263-267(1995) (秀潤社発行)、ウイルス学 (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行うことができる。このようにして、G11タンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。宿主がエンシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸三水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

【0031】エンシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地

〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Journal of Experimental Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働くさせるために、例えば、3-β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエンシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行い、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Barkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Hitler, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0032】宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 783(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], DMEM培地 [ウイルス学 (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association), 199巻, 519(1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・メサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)] などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

【0033】上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行うことがで

きる。本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトンX-100[®]などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液に含まれるタンパク質の精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行うことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や酢酸沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

【0034】このようにして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。タンパク質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテinkinナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。このようにして生成する本発明のG111タンパク質またはその塩の活性は、例えばG111結合配列を持つ二本鎖DNAへの結合能等を指標に測定することができる。

【0035】本発明におけるG111タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明におけるG111タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。本発明におけるG111タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のタンパク質等と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のタンパク質等を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

【0036】〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質等は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2〜6週毎に1回ずつ、計2〜10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2〜5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行うことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法（ネイチャー（Nature）、256巻、495頁（1975年））に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/Oなどが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1〜20:1程度であり、PEG（好ましくは、PEG1000〜PEG6000）が10〜80%程度の濃度で添加され、約20〜40℃、好ましくは約30〜37℃で約1〜10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

【0037】モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質等の抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行うことができるが、通常はHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行うことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地

を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日本製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20~40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行うことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定で

【0038】(b)モノクローナル抗体の精製
モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法（例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの固定吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法）に従って行うことができる。

【0039】〔ポリクローナル抗体の作製〕本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質等の抗原）とキャリアタンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明のタンパク質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造できる。哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアとハプテンとの混合比は、キャリアに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率的くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンバット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1~20、好ましくは約1~5の割合でカプルさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアのカプリングには、種々の結合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。結合生成物は、哺乳動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2~6週毎に1回ずつ、計約3~10回程度行うことができる。ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗

体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。

【0040】(1) G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、または該タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAは骨・軟骨分化誘導剤として有用である。

(2) G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、G111遺伝子DNAもしくはその相補DNAまたはその部分DNAおよびG111タンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する細胞は、G111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物、G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化合物、ひいては骨・軟骨分化調節作用を有する化合物等のスクリーニングに用いることができる。

(3) G111遺伝子のアンチセンスDNA等は、所謂遺伝子治療剤（骨・軟骨分化阻害剤または骨・軟骨形成過剰症の予防・治療剤）として、または遺伝子診断剤（骨・軟骨疾患の診断剤）などとして有用である。

(4) G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の抗体は骨・軟骨疾患の診断剤として有用である。

G111タンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のタンパク質等と略記する場合がある）、G111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、G111タンパク質等に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、G111遺伝子のアンチセンスDNAの用途等について、以下に具体的に説明する。

【0041】(1) 骨・軟骨分化誘導剤

① G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、または該タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAは骨・軟骨分化誘導剤などの医薬として使用することができる。例えば、生体内においてG111タンパク質またはヘッジホッグが減少しているために、またはヘッジホッグによるシグナルが有効に伝達されないためにG111遺伝子またはその産物による生理作用（転写活性、骨・軟骨分化誘導作用など）が期待できない（該G111タンパク質の欠乏症）患者がいる場合に、① G111タンパク質等を該患者に投与し該タンパク質の量を補充したり、② (イ) 本発明のタンパク質をコードするDNAあるいは該DNAを含有する組換えベクターを該患者に投与し発現させることによって、あるいは(ロ) 対象となる細胞（例えば、グリア細胞、骨髄細胞、表皮細胞、繊維芽細胞、筋芽細胞、軟骨細胞、骨細胞もしくは骨芽細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞等）に本発明のタンパク質をコードするDNAを

挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけるG111タンパク質の量を増加させ、転写活性、骨・軟骨分化誘導作用を充分に発揮させることができる。すなわち、本発明のタンパク質または該タンパク質をコードするDNAは、安全で低毒性な骨・軟骨分化誘導剤として有用である。本発明のタンパク質または該タンパク質をコードするDNAは骨・軟骨疾患、例えば整形外科領域の疾患（例、骨折、変形性関節症、骨関節炎、半月板損傷等の軟骨損傷、外傷、腫瘍摘出などによる骨・軟骨欠損部の再生、脊椎固定術、脊椎管拡大術などの骨再建、骨形成不全症、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患）、歯科領域の疾患（例、口蓋裂、下顎骨再建術、歯槽堤形成術などの骨再建）、骨粗鬆症などの予防・治療剤などの医薬として用いることができる。また、美容外科領域における骨移植の治療剤などの医薬としても用いることができるし、再生医療における自家移植の際の分化誘導剤としても利用できる。本発明のタンパク質を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。一方、本発明のタンパク質をコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）を上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。例えば、①本発明のタンパク質または②該タンパク質をコードするDNAは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、①本発明のタンパク質または②該タンパク質をコードするDNAを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

【0042】錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチャリーの様な香味剤などが用いられる。調剤単位形態

がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート80TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

【0043】また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無菌化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。本発明のタンパク質の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、軟骨損傷患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、軟骨損傷患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たり換算した量を投与することができる。本発明のDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、軟骨損傷患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、軟骨損傷患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01~30mg程度、好

ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0044】(2) ①G111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物、②G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化合物または③骨・軟骨分化調節作用を有する化合物のスクリーニング方法

上記したごとく、G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、G111遺伝子DNAもしくはその相補DNAまたはその部分DNAおよびG111タンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する細胞は、G111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物やG111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化合物等のスクリーニングに用いることができ、ひいては骨・軟骨分化調節作用を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。G111遺伝子を発現する能力を有する細胞としては、温血動物（例えば、ヒト、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サル等）の細胞（例えば、グリア細胞、骨髄細胞、表皮細胞、繊維芽細胞、筋芽細胞、軟骨細胞、骨細胞もしくは骨芽細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞等）が用いられる。特に、骨または軟骨への分化能を有する細胞あるいは既に分化形態を示している細胞が好ましく、軟骨細胞、繊維芽細胞（例、マウス繊維芽細胞株C3H10T1/2）、筋芽細胞（例、マウス筋芽細胞株C2C12）などがより好ましい。

【0045】以下に、本発明のG111遺伝子の発現を制御（促進または阻害）する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法について詳述する。G111遺伝子発現はヘッジホッグと呼ばれる可溶性タンパク質によるシグナル伝達によって誘導され、骨形成を誘導し、骨・軟骨分化促進活性を有するため、G111遺伝子の発現を促進する活性を有する化合物またはその塩は、骨・軟骨分化調節（特に促進）作用を有し、骨・軟骨疾患、例えば整形外科領域の疾患（例、骨折、変形性関節症、骨関節炎、半月板損傷等の軟骨損傷、外傷、腫瘍摘出などによる骨、軟骨欠損部の再生、脊椎固定術、脊柱管拡大術などの骨再建、骨形成不全症、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患）、歯科領域の疾患（例、口蓋裂、下顎骨再建術、歯槽堤形成術などの骨再建）、骨粗鬆症などの予防・治療剤などの医薬として用いることができる。また、美容外科領域における骨移植の治療剤などの医薬としても用いることができるし、再生医療における自家移植の際の分化誘導剤としても利用できる。一方、G111遺伝子の発現を阻害する活性を有する化合物またはその塩は、骨・軟骨分化調節（特に阻害）作用を有し、例えば骨・軟骨形成過剰症などの治療

・予防剤などの医薬として使用できる。したがって、G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、G111遺伝子DNAもしくはその相補DNAまたはその部分DNAまたはG111遺伝子を発現する能力を有する細胞は、G111遺伝子の発現を制御（促進または阻害）する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング、ひいては骨・軟骨分化調節作用を有する化合物のスクリーニングのための材料として用いることができる。

【0046】すなわち、本発明は、①G111遺伝子を発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下に培養し、G111遺伝子DNAもしくはその相補DNAまたはその部分DNAを用いてG111タンパク質をコードするmRNA（以下、G111mRNAと略称する場合がある。）の量を測定することを特徴とするG111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法、より具体的には、②(i) G111遺伝子を発現する能力を有する細胞を培養した場合のG111mRNAの発現量と、(ii) G111遺伝子を発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下に培養した場合のG111mRNAの量との比較を行うことを特徴とする、G111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。G111遺伝子を発現する能力を有する細胞としては、例えば、前記したG111遺伝子を発現する能力を有する公知の温血動物細胞などがあげられる。G111遺伝子を発現する能力を有する公知の温血動物細胞としては、例えば、骨または軟骨への分化能を有する細胞あるいは既に分化形態を示している細胞が好ましく、具体的には軟骨細胞、繊維芽細胞（例、マウス繊維芽細胞株C3H10T1/2）、筋芽細胞（例、マウス筋芽細胞株C2C12）などが用いられる。G111遺伝子を発現する能力を有する細胞の培養は、公知の動物細胞培養法と同様にして行われる。例えば、培地としては、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science)、122巻、501(1952)〕、DMEM培地〔ヴィロロジー (Virology)、8巻、396(1959)〕、RPMI1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻、519(1967)〕、199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine)、73巻、1(1950)〕等が用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30～40℃で約15～60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加えてもよい。発現誘導剤を接触させることによってG111遺伝子が発現する動物細胞を用いる場合には、該動物細胞を発現誘導剤の存在下または非存在下に培養することができる。

【0047】 mRNAの発現量の比較をハイブリダイゼーション法によって行うには、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング

(Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法等に従って行うことができる。具体的には、G111タンパク質をコードするmRNAの量の測定は、公知の方法に従って細胞から抽出したRNAとG111遺伝子をコードするDNA (G111遺伝子DNA) もしくはその相補DNAまたはその部分DNAとを接触させ、G111遺伝子DNAまたはその相補DNAに結合したmRNAの量を測定することによって行われる。G111遺伝子DNAの相補DNAまたはその部分DNAを、例えば放射性同位元素、色素などで標識することによって、G111遺伝子DNAの相補DNAに結合したG111 mRNAの量が容易に測定できる。放射性同位元素としては、例えば³²P、³Hなどが用いられ、色素としては、例えばfluorescein, FAM (PE Biosystems社製)、JOE (PE Biosystems社製)、TAMRA (PE Biosystems社製)、ROX (PE Biosystems社製)、Cy5 (Amersham社製)、Cy3 (Amersham社製) などの蛍光色素が用いられる。また、G111 mRNAの量は、細胞から抽出したRNAを逆転写酵素によってcDNAに変換した後、G111遺伝子をコードするDNAもしくはその相補DNAまたはその部分DNAをプライマーとして用いるPCRによって、増幅されるcDNAの量を測定することによって行うことができる。G111 mRNAの量の測定に用いられるG111遺伝子DNAの相補DNAとしては、G111遺伝子DNA (上鎖) に相補的な配列を有するDNA (下鎖) があげられる。G111遺伝子DNAの部分DNAとしては、例えばG111遺伝子DNAの塩基配列中、連続した10~2200個程度、好ましくは10~300個程度、さらに好ましくは10~30個程度の塩基から構成される塩基配列があげられる。G111遺伝子DNAの相補DNAの部分DNAとしては、例えば前記したG111 DNAの部分DNAに相補的な配列を有するDNAがあげられる。即ち、例えばG111遺伝子DNAの塩基配列中、連続した10~2200個程度、好ましくは10~300個程度、さらに好ましくは10~30個程度の塩基から構成される塩基配列に相補的な配列を有するDNAがあげられる。PCRに用いられるプライマーとしては、例えば配列番号: 1で表される塩基配列を含有するDNAおよび配列番号: 2で表される塩基配列を含有するDNAなどがあげられる。G111 mRNAの量を増加させる試験化合物を、G111遺伝子の発現を促進する活性を有する化合物あるいは骨・軟骨分化調節 (特に促進) 作用を有する化合物として選択することができ、またG111 mRNAの量を減少させる試験化合物を、G111遺伝子の発現を阻害する活性を有する化合物あるいは骨

・軟骨分化調節 (特に阻害) 作用を有する化合物として選択することができる。

【0048】 上記①~③に示したスクリーニング方法において試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよい、公知の化合物であってもよい。

【0049】 また、本発明は、④G111の公知プロモーターやエンハンサー領域をゲノムDNAよりクローニングし、適当なレポーター遺伝子の upstream に連結させたDNAで形質転換した細胞 (例えば、軟骨細胞、繊維芽細胞 (例、マウス繊維芽細胞株C3H10T1/2)、筋芽細胞 (例、マウス筋芽細胞株C2C12) など) を試験化合物の存在下で培養し、G111の発現に代えてレポーター遺伝子の発現を検出することとを特徴とする。G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法、ひいてはG111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。レポーター遺伝子としては、例えば、lacZ (ゴーダラクトンダーゼ遺伝子) などの染色マーカー遺伝子等などが用いられる。レポーター遺伝子産物 (例、mRNA、タンパク質) の量を公知の方法を用いて測定することによって、レポーター遺伝子産物の量を増加させる試験化合物をG111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御 (特に促進) する作用を有する化合物、すなわちG111遺伝子の発現を促進する活性を有する化合物として選択でき、逆に、レポーター遺伝子産物の量を減少させる試験化合物をG111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御 (特に阻害) する作用を有する化合物、すなわちG111遺伝子の発現を阻害する活性を有する化合物として選択することができる。試験化合物としては、前記と同様のものが使用される。細胞の培養は、公知の動物細胞培養と同様に行うことができる。

【0050】 また、本発明は、⑤G111タンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、軟骨分化のマーカー遺伝子の発現量を測定することとを特徴とする骨・軟骨分化調節 (促進または阻害) 作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。軟骨分化のマーカー遺伝子としてはI型Bコラーゲン遺伝子が好ましい。軟骨分化のマーカー遺伝子の発現量の測定は例えば配列番号: 5、6、7または8で表される塩基配列を有するプライマーを用いたRT-PCR法を実施することにより測定することができる。軟骨分化のマーカー遺伝子の発現量を増加させる試験化合物を、骨・軟骨分化調節 (特に促進) 作用を有する化合物として選択することができ、また軟骨分化のマーカー遺伝子の発現

量を減少させる試験化合物を、骨・軟骨分化調節（特に阻害）作用を有する化合物として選択することができる。試験化合物としては、前記と同様のものが使用される。細胞の培養は、公知の動物細胞培養と同様に行うことができる。

【0051】また、本発明は、G111タンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、細胞の軟骨分化状態、例えば軟骨分化マーカーの発現を測定することを特徴とする骨・軟骨分化調節（促進または阻害）作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。試験化合物としては、前記と同様のものが使用される。細胞の培養は、公知の動物細胞培養と同様に行うことができる。

【0052】さらに、G111タンパク質はG111遺伝子自身の転写あるいは、脳もしくは肺の分化に関与するHNF-3β遺伝子の転写を誘導していると報告されている。したがって、例えば上記した①または②のスクリーニング方法を実施することにより直接的にG111タンパク質の転写活性を測定できるか、またはHNF-3βを発現し得る細胞株を用いれば例えば上記した①または②に記載の方法に準じてHNF-3βのmRNAの発現量を試験化合物の存在下および非存在下で測定し、比較することによりG111タンパク質の転写活性を測定することも可能である。

【0053】本発明のスクリーニング用キットには上記スクリーニング方法を実施するため、上記のG111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、またはG111遺伝子またはその産物を産生する能力を有する細胞、またはG111遺伝子発現レポーターベクターを導入した細胞（G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーをレポーター遺伝子に連結させたDNAで形質転換した細胞）、およびG111遺伝子DNAもしくはその増補DNAまたはその部分DNAを含有するものである。

【0054】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、G111遺伝子の発現を制御（促進または阻害）する活性を有する化合物あるいはG111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御（促進または阻害）する作用を有する化合物、ひいては骨・軟骨分化調節作用を有する化合物である。該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）等との塩が挙げられる。G111遺伝子の発現を促進する活性を有する化合物（またはG111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を促進する作用を有する化

合物、骨・軟骨分化誘導作用を有する化合物）またはその塩は、骨・軟骨疾患、例えば整形外科領域の疾患

（例、骨折、変形性関節症、骨関節炎、半月板損傷等の軟骨損傷、外傷、腫瘍摘出などによる骨・軟骨欠損部の再生、脊椎固定術、脊柱管拡大術などの骨再建、骨形成不全症、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患）、歯科領域の疾患（例、口蓋裂、下顎骨再建術、歯槽堤形成術などの骨再建）、骨粗鬆症などの予防・治療剤などの医薬として用いることができる。また、美容外科領域における骨移植の治療剤などの医薬としても用いることができるし、再生医療における自家移植の際の分化誘導剤としても利用できる。一方、G111遺伝子の発現を阻害する活性を有する化合物（またはG111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を阻害する作用を有する化合物、骨・軟骨分化阻害作用を有する化合物）またはその塩は、例えば骨・軟骨形成過剰症などの治療・予防剤などの医薬として使用できる。

【0055】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとして、経口的または非経口的に投与することができる。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、温血動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど；好ましくは哺乳動物）に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、軟骨損傷の治療目的でG111遺伝子の発現を促進する活性を有する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～1.00mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、軟骨損傷の治療目的でG111遺伝子の発現を促進する活性を有する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たり換算した量を投与することができる。一方、骨・軟骨形成過剰症の治療目的でG111遺伝子の発現を阻害する活性を有する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対

象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、骨・軟骨形成過剰症の治療目的でG111遺伝子の発現を阻害する活性を有する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0056】(3) アンチセンスヌクレオチドを含有する医薬（骨・軟骨分化阻害剤）または診断剤（骨・軟骨疾患の診断剤）

本発明で用いられるDNAに相補的に結合し、前記DNAの発現を抑制することができる本発明で用いられるアンチセンスヌクレオチド（例、アンチセンスDNA）は低毒性であり、生体内における本発明で用いられるタンパク質または本発明で用いられるDNAの機能抑制することができるので、例えば、骨・軟骨形成過剰症などの治療・予防剤などとして使用することができる。上記アンチセンスヌクレオチドを上記の予防・治療剤として使用する場合は、公知の方法に従って製剤化し、投与することができる。例えば、前記アンチセンスヌクレオチドを用いる場合、前記アンチセンスヌクレオチドを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、温血動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど、好ましくは哺乳動物）に対して経口的または非経口的に投与することができる。前記アンチセンスヌクレオチドは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やマイクロカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。前記アンチセンスヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、骨・軟骨形成過剰症の治療の目的で本発明で用いられるアンチセンスヌクレオチドを経口投与する場合、成人（体重60kg）に対し、一日につき前記アンチセンスヌクレオチドを約0.1～100mg投与する。さらに、前記アンチセンスヌクレオチドは、組織や細胞における本発明で用いられるDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。上記アンチセンスヌクレオチドと同様に、二本鎖RNA、リボザイム、デオイオリゴヌクレオチドなども、前記DNAの発現を抑制することができ、生体内における本発明で用いられるタンパク質または本発明で用いられるDNAの機能抑制することができるので、例えば、骨・軟骨形成過剰症の予防・治療剤などとして使用することができる。二本鎖RNAは、公知の方法（例、

Nature, 411巻、494頁、2001年）に準じて、本発明で用いられるDNAの配列を基に設計して得られる。リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻、221頁、2001年）に準じて、本発明で用いられるDNAの配列を基に設計して得られる。デオイオリゴヌクレオチドは、公知の方法（例、The Journal of Clinical Investigation, 106巻、1071頁、2000年）に準じて、本発明で用いられるDNAの配列を基に設計して得られる。G111は転写因子であるのでG111の結合配列を含むデオイG111バインディングオリゴヌクレオチド（例えば5'-GAGCACCA-3' (Kinzler KW, Vogelstein B., Mol. Cell Biol. 1990 Feb;10(2): 634-42)を含有するオリゴヌクレオチドなど）などを有効に使用できる。上記の予防・治療剤として使用する場合、公知の方法に従って製剤化し、投与することができる。

【0057】(4) 遺伝子診断剤

本発明のDNAまたはアンチセンスDNAは、プローブとして使用することにより、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。本発明のDNAまたはアンチセンスDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミクス (Genomics), 第5巻、874～879頁（1989年）、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユエスエー (Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA), 第86巻、2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするmRNAの発現低下が検出された場合は、例えば、骨・軟骨疾患、例えば整形外科領域の疾患（例、骨折、変形性関節症、骨関節炎、半月板損傷等の軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患）、歯科領域の疾患（例、口蓋裂）、骨粗鬆症などの疾患である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。一方、ノーザンハイブリダイゼーションにより本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするmRNAの発現過多が検出された場合は、例えば、骨・軟骨形成過剰症などの疾患である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

【0058】(5) G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の抗体を用いた診断剤
G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの

場、抗体（以下、本発明の抗体と略称する場合がある）は、本発明のタンパク質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、(i)本発明の抗体と、被検液および標識化タンパク質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化タンパク質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質等の定量法、(ii)被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質等の定量法を提供する。上記(ii)においては、一方の抗体が本発明のタンパク質等のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質等のC端部に反応する抗体であることが好ましい。

【0059】本発明のタンパク質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質等の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行うこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')₂、Fab'、あるいはFabも画分を用いてもよい。本発明のタンパク質等に対する抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後に記載するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、¹²⁵I、¹²⁵I、³H、

¹⁴Cなどが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ペーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

【0060】抗原あるいは抗体の不溶化に当たっては、物理吸着を用いてもよく、また通常、タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えば、アガロー

ス、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が用いられる。サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）した後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は上記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。本発明のサンドイッチ法によるタンパク質等の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体はタンパク質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、タンパク質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

【0061】本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、上記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加えて未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。また、ネフロメトリーでは、グル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が低くあり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0062】これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の

条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質等の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる（例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川榮治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和59年発行）、石川榮治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川榮治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「メソッズ・イン・エンザイモロジー（Methods in ENZYMOLOGY）」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))（以上、アカデミックプレス社発行）など参照）。以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質等を感度良く定量することができる。さらに、本発明の抗体を用いて、生体内での本発明のタンパク質等を定量することによって、上記したような各種骨・軟骨疾患の診断をすることができる。例えば、上記の定量法を用いることにより本発明のタンパク質またはその部分ペプチドの濃度減少が検出された場合は、例えば、骨・軟骨疾患、例えば整形外科領域の疾患（例、骨折、変形性関節症、骨関節炎、半月板損傷等の軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患）、歯科領域の疾患（例、口蓋裂）、骨粗鬆症などの疾患である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。一方、上記の定量法を用いることにより本発明のタンパク質またはその部分ペプチドの濃度上昇が検出された場合は、例えば、骨・軟骨形成過剰症などの疾患である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質等を特異的に検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質等の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

【0063】(6) DNA転移動物

本発明は、外来性の本発明のタンパク質等をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。すなわち、本発明は、(1) 本発明の外来性DNAまたは

その変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、(2) 非ヒト哺乳動物がゲン動物である第(1)記載の動物、(3) ゲン動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および(4) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-セキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作出することもできる。

【0064】非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲン動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F1系統、BDF1系統、B6D2F1系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar、SDなど）などが好ましい。哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどが挙げられる。本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本

発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相溶性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

【0065】本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、λファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンI、ウロプラキシンI、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリコシル化タンパク質、グルコチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子β、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼβIサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムATPase、βリン酸化酵素（Na、K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロテイナーゼI組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミンβ-水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ポリペプチド鎖延長因子1α（EF-1α）、βアクチン、αおよびβミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Tbγ-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋αアクチン、プレプロエンケファリンA、パンクレアチンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子1α（EF-1α）のプロモーター、ヒトおよびマウスβアクチンプロモーターなどが好適である。

【0066】上記ベクターは、DNA転移哺乳動物にお

いて目的とするmRNAの転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネーターなどが用いられる。その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。正常な本発明のタンパク質の翻訳領域は、各種哺乳動物（例えば、ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、繊維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、繊維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なタンパク質の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。該翻訳領域は転移動物において発現するDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常の遺伝子工学的手法により作製することができる。受精細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

【0067】本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。受精細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。本発明の正常DNAを

有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のタンパク質の機能亢進症（例、転写、骨・軟骨分化誘導などの亢進症）を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。また、本発明の外來性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

【0068】一方、本発明の外來性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外來性DNAを安定に保持することを確立して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外來DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常の遺伝子工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴット動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。また、本発明の外來異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

【0069】また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、①組織培養の

ための細胞源としての使用、②本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたタンパク質組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するタンパク質との関連性についての解析、③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、④上記②記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および⑤本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外來性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

【0070】（7）ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。すなわち、本発明は、（1）本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、

（2）該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第（1）項記載の胚幹細胞、（3）ネオマイシン耐性である第（1）項記載の胚幹細胞、（4）非ヒト哺乳動物がげん動物である第（1）項記載の胚幹細胞、（5）げん動物がマウスである第（4）項記載の胚幹細胞、（6）本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、（7）該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポ-

ター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、

(8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、(9) ゲッ歯動物がマウスである第(8)項記載の非ヒト哺乳動物、および(10) 第

(7)項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

【0071】本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、胚非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現能を有さない(以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある)非ヒト哺乳動物の胚幹細胞(以下、ES細胞と略記する)をいう。非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他のDNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞(以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する)の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ(β-ガラクトシダーゼ遺伝子)、cat(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子)を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列(例えば、ポリA付加シグナルなど)を挿入し、完全なmRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA細胞(以下、ターゲットティングベクターと略記する)を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはクローニングベクター上のDNA配列とクローニングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

【0072】また、相同組換え法等により本発明のDN

Aを不活性化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知EvansとKaufmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF1マウス(C57BL/6とDBA/2とのF1)を用いて樹立したものなども良好に用いうる。BDF1マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例として挙げることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約 10^5 個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクトションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雌雄の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

【0073】また、第二次セレクトションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞(例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞)に再びクローニングすることが望ましい。このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF($1-10000$ U/ml)存在下に炭酸ガス培養器内(好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気)で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液(通常0.001-0.5%トリプ

シン/0.1-5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mM EDTA)処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり(M. J. Evans及びM. H. Kaufman, ナイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin, プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschmanら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第97巻、27頁、1985年)、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

【0074】本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた母非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のD

NA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同士を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選別することにより得られる。

【0075】このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育を行なうことができる。さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母体動物に対して、正常個体1、ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

【0076】(7a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病、例えば、骨・軟骨疾患、例えば整形外科領域の疾患(例、骨折、変形性関節症、骨関節炎、半月板損傷等の軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患)、歯科領域の疾患(例、口蓋裂)、骨粗鬆症などの疾患に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする。本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。該スクリーニング方法に

において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが挙げられる。試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。例えば、GLI1遺伝子発現不全に起因して起こるような軟骨損傷治療不全に対して治療・予防効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に骨・軟骨損傷処置（例えば、骨折など）を行ない、骨・軟骨損傷処置前または処置後に試験化合物を投与し、該動物の軟骨分化マーカーの発現量、体重変化などを経時的に測定する。該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の軟骨分化マーカーが約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上上昇した場合、該試験化合物を軟骨損傷に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

【0077】本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質等の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患、例えば、骨・軟骨疾患、例えば整形外科領域の疾患（例、骨折、変形性関節症、骨関節炎、半月板損傷等の軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患）、歯科領域の疾患（例、口蓋裂）、骨粗鬆症などの疾患に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例アルカリ金属）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蘇酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。該スクリーニ

ング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質の活性を調節する化合物を含有する医薬と同様にして製造することができる。このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、軟骨損傷の治療目的で該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、軟骨損傷の治療目的で該化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たり換算した量を投与することができる。

【0078】（7b）本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進する化合物をスクリーニング方法
本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。試験化合物としては、前記と同様のものが挙げられる。レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

【0079】例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例

例えば、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-ガラクトピラノシド(X-gal)のようなβ-ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液(PBS)で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄すること

によって、β-ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、電法に従い、lacZをコードするmRNAを抽出してもよい。

【0080】上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸)や塩基(例、有機酸)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現を促進し、該タンパク質の機能を促進することができるので、例えば、骨・軟骨疾患、例えば整形外科領域の疾患(例、骨折、変形性関節症、骨関節炎、半月板損傷等の軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患)、歯科領域の疾患(例、口蓋裂)、骨粗鬆症などの疾患などに対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として有用である。

【0081】該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物(例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、軟骨損傷の治療目的で本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20

mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、軟骨損傷の治療目的で本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人(60kgとして)に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物(遺伝子移入動物)を作成すれば、特異的にそのタンパクを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。また該プロモーター部分を解析することにより新たなシスエレメントやそれに結合する転写因子を見つけることも可能である。

【0082】本明細書および図面において、塩基やアミノ酸等を略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン

57

Cys : システイン
 Met : メチオニン
 Glu : グルタミン酸
 Asp : アスパラギン酸
 Lys : リジン
 Arg : アルギニン
 His : ヒスチジン
 Phe : フェニルアラニン
 Tyr : チロシン
 Trp : トリプトファン
 Pro : プロリン
 Asn : アスパラギン
 Gln : グルタミン
 pGln : ピログルタミン酸

【0083】本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

【配列番号：1】G111 mRNAの量を測定する際に使用できるPCR用プライマーを示す。(実施例4および5)

【配列番号：2】G111 mRNAの量を測定する際に使用できるPCR用プライマーを示す。(実施例4および5)

【配列番号：3】マウスG111 cDNAの取得のために使用したプライマーを示す。

【配列番号：4】マウスG111 cDNAの取得のために使用したプライマーを示す。

【配列番号：5】実施例1、2および4のRT-PCRで使用したプライマーを示す。

【配列番号：6】実施例1、2および4のRT-PCRで使用したプライマーを示す。

【配列番号：7】実施例3のRT-PCRで使用したプライマーを示す。

【配列番号：8】実施例3のRT-PCRで使用したプライマーを示す。

【配列番号：9】マウスG111遺伝子(cDNA)の塩基配列を示す。

【配列番号：10】マウスG111タンパク質のアミノ酸配列を示す。

【配列番号：11】ヒトG111タンパク質のアミノ酸配列を示す。

【配列番号：12】ヒトG111遺伝子(cDNA)の塩基配列を示す。

【配列番号：13】ヒトG111変異タンパク質1のアミノ酸配列を示す。

【配列番号：14】ヒトG111変異遺伝子1(cDNA)の塩基配列を示す。

【配列番号：15】ヒトG111変異タンパク質2のアミノ酸配列を示す。

【配列番号：16】ヒトG111変異遺伝子2(cDNA)の塩基配列を示す。

58

【配列番号：17】ヒトG111変異タンパク質3のアミノ酸配列を示す。

【配列番号：18】ヒトG111変異遺伝子3(cDNA)の塩基配列を示す。

【配列番号：19】マウスG113タンパク質のアミノ酸配列を示す。

【配列番号：20】マウスG113遺伝子(cDNA)の塩基配列を示す。

10 【配列番号：21】ヒトG113タンパク質のアミノ酸配列を示す。

【配列番号：22】ヒトG113遺伝子(cDNA)の塩基配列を示す。

【0084】

【実施例】以下に、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はそれらに限定されるものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作は、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)に記載されている方法に従い、各種キット類の使用法は添付されているマニュアルに従った。

20 【0085】まず実施例に用いたG111およびScleraxis発現ベクターの作製方法、細胞培養条件、遺伝子導入法を以下に示す。

【G111発現ベクターの調製】マウス19日胎児ライブラリーより配列番号：3および4に示すプライマーを使用し、PfuTurbo(Stratagene)DNA polymeraseを用いてPCR法にてマウスG111 cDNAを得た。得られた断片はpCRblunt(Invitrogen)ベクターにクローニング後、塩基配列を決定した。その結果、得られた遺伝子は公知のマウス遺伝子であるAF026305とはアミノ酸レベルで24個、またAB025922とは同じく2個の異なる配列を有していた【DNA配列：配列番号：9(マウスG111遺伝子の塩基配列は具体的には配列番号：9の第213番目のAから第354番目のCまでの塩基配列)。タンパク質のアミノ酸配列：配列番号：10および図1】。次にこのベクターをNotI、HindIIIで消化し、pCDNA3.1(Invitrogen)にG111断片をサブクローニングすることによって動物細胞発現ベクターを調製した。

30 【Scleraxis発現ベクターの調製】Scleraxisは骨・軟骨分化に関与することが報告されている(Liu, Y. et al. J. Biol. Chem. (1997) 272, 29880-29885)、その機能の詳細は不明なところが多い転写因子である。マウスライブラリーよりPCR法にてマウスScleraxis cDNAを得た。得られた断片はpCRblunt(Invitrogen)ベクターにクローニング後、BamHI-XhoIで消化し、pCDNA3.1(Invitrogen)にScleraxis断片をサブクローニングすることによって動物細胞発現ベクターを調製した。

50 【細胞培養法】マウス繊維芽細胞株C3H10T1/2

株、およびマウス胚芽細胞腫C2C12はATCCより購入し、10% FBSを含むDMEM (GIBCO) にて培養した。ヒト正常軟骨細胞は東洋紡より購入しヒト正常軟骨細胞培養キットに含まれるChondrocytes growth mediumを用い、細胞培養ディッシュ (Falcon) で培養した。なお、この細胞はディッシュで培養しているため脱分化しており、軟骨細胞マーカーであるI型Bコラーゲン遺伝子は発現しなくなっている。

【遺伝子導入法】ウェルあたり約15万個の細胞を24ウェルプレートに播き、翌日上記発現ベクターとFugene 6 (ベリンガー) を混和し、各種細胞に添加することによってトランスフェクションした。

【化合物添加法】ウェルあたり約20万個の細胞を24ウェルプレートに播き、2時間後、ジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解した9-(2-Tetrahydrofuryl)adenine (THFA) を添加した。最終DMSO濃度は0.1% (v/v) 以下とした。

【発現量比較】トランスフェクション、あるいは化合物添加後2日目にRNeasy mini kit (Qiagen) を用いてRNAを抽出し、message clean kit (genhunter) でDNase処理した後、RNA PCR kit (Takara) に従いRT-PCRを行った。反応後、アガロースゲルにて電気泳動し、Gel image (Genomic solutions) を用いて目的のバンドの比較を行った。

【0086】実施例1 G111発現ベクター導入によるマウスC3H10T1/2細胞の軟骨分化に及ぼす影響

G111発現ベクターまたはpcDNA3.1をC3H10T1/2細胞株にトランスフェクション後、2日目に配列番号：5および6に示すプライマーを用いてRT-PCRを行ったところ軟骨分化のマーカーであるI型Bコラーゲン遺伝子 (Col2a1) の発現が、ベクターpcDNA3.1 (Invitrogen) を導入した場合を1とするとG111を導入すると3.0を示した。また、この時間時にSonic hedgehog, Indian hedgehogおよびScleraxisの発現を見たが、全く発現を認めなかった。

【0087】実施例2 G111発現ベクター導入によるマウスC2C12細胞の軟骨分化に及ぼす影響

G111発現ベクターまたはpcDNA3.1をC2C12細胞株にトランスフェクション後2日目に配列番号：5および6に示すプライマーを用いてRT-PCRを行ったところ、この細胞はベクターpcDNA3.1を導入した場合Col2a1を全く発現していなかったのに対し、G111遺伝子を導入することによってCol2a1の発現を認めた。

【0088】実施例3 G111発現ベクター導入による脱分化型ヒト正常軟骨細胞の再分化に及ぼす影響

G111発現ベクターまたはpcDNA3.1を脱分化型ヒト正常軟骨細胞にトランスフェクション後2日目に

配列番号：7および8に示すプライマーを用いてRT-PCRを行ったところ、この細胞はベクターpcDNA3.1を導入した場合Col2A1を全く発現していなかったのに対し、G111遺伝子を導入することによってCol2A1の発現を認めた。

【0089】実施例4 マウスC3H10T1/2細胞の軟骨分化に及ぼすScleraxis遺伝子の発現による軟骨分化に及ぼす効果

マウスC3H10T1/2細胞の軟骨分化に及ぼすG111以外の転写因子の発現による軟骨分化に及ぼす効果を見るために、Scleraxis遺伝子をトランスフェクションした。トランスフェクション2日目に配列番号：5および6に示すプライマーを用いてRT-PCRを行ったところ軟骨分化のマーカーであるI型Bコラーゲン遺伝子 (Col2a1) の発現が、ベクターpcDNA3.1を導入した場合の約2倍向上していた。この時間様にScleraxis遺伝子発現によるG111遺伝子の発現を配列番号：1および2に示すプライマーを用いて見たところpcDNA3.1を導入した場合の約2.5倍向上していることがわかった。このことはScleraxisの軟骨分化に対する効果はG111の発現上昇に起因することを示唆しているが、Sonic hedgehogおよびIndian hedgehogはこの条件ではいずれも発現しておらず、Scleraxisはヘッジホッグを介さずにG111を誘導しうることがわかった。即ちヘッジホッグタンパク質を用いなくともG111を介した軟骨分化を誘導しうることが明らかとなった。

【0090】実施例5 G111発現を誘導する低分子化合物の探索

C3H10T1/2細胞を用いてG111発現を誘導する低分子化合物を探索した。その結果、9-(2-Tetrahydrofuryl)adenine (THFA) を500 μ Mで添加すると2日後にはG111遺伝子の発現はDMSO添加時に比べ約2.3倍向上していることが配列番号：1および2に示すプライマーを使用したRT-PCRにてわかった。この時Col2a1の発現も約2.3倍向上していた。この場合もScleraxisやSonic hedgehog, Indian hedgehogの発現は認められず、THFAの軟骨分化誘導効果はヘッジホッグタンパクを介さずにG111を誘導することに起因していることがわかった。以上の結果より、G111の発現の増減を指標として選択される化合物は骨・軟骨疾患予防、治療薬として有望であることが判明した。また上記の実験はマウスの遺伝子を用いて実施されたが、ヒトの遺伝子とマウスの遺伝子には非常に高い相関性があることは既知であり、ヒトの遺伝子を用いてもこれらの結果と同様の結果が得られることは容易に予測できる。

【0091】

【発明の効果】G111遺伝子またはその産物は骨あるいは軟骨分化誘導活性をするため、整形外科領域の疾患

(例、骨折、変形性関節症、骨関節炎、半月板損傷等の軟骨損傷、外傷、腫瘍摘出などによる骨、軟骨欠損部の再生、脊椎固定術、脊柱管拡大術などの骨再建、骨形成不全症、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患)または、歯科領域の疾患(例、口蓋裂、下顎骨再建術、歯槽堤形成術などの骨再建)、さらには骨粗鬆症などの予防・治療剤として用いることができる。また、美容外科領域における骨移植の治療剤としても用いることができるし、再生医療における自家移植の際の分化誘導剤としても利用できる。また、G111タンパク質等を用いたスクリーニング方法、G111遺伝子を発現する能力を有する細胞を用いたスクリーニング方法またはレポーター遺伝子発現形質転換体を用いたスクリーニング方法は、G111遺伝子の発現を制御(促進または阻害)する活性を有する化合物、G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御(促進または阻害)する作用を有する化合物、骨・軟骨分化調節(促進または阻害)作用を有する化合物、またはそれらの塩の探索に用いることができる。このような化合物を用いてG111遺伝子またはその産物の作用(例、転写活性)を増強ま

10

*20

*または活性化することによって骨・軟骨分化を誘導することができる。上記スクリーニングにより得られうるG111遺伝子の発現を促進する活性を有する化合物などは骨、あるいは軟骨誘導活性を有するため、整形外科領域の疾患(例、骨折、変形性関節症、骨関節炎、半月板損傷等の軟骨損傷、外傷、腫瘍摘出などによる骨、軟骨欠損部の再生、脊椎固定術、脊柱管拡大術などの骨再建、骨形成不全症、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患)または、歯科領域の疾患(例、口蓋裂、下顎骨再建術、歯槽堤形成術などの骨再建)、さらには骨粗鬆症などの予防・治療剤として用いることができる。また、美容外科領域における骨移植の治療剤としても用いることができるし、再生医療における自家移植の際の分化誘導剤としても利用できる。一方、上記スクリーニングにより得られうるG111遺伝子の発現を阻害する活性を有する化合物やG111遺伝子のアンチセンスDNAなどは、例えば骨・軟骨形成過剰症の予防・治療剤として用いることができる。

【0092】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

- <110> Takeda Chemical Industries, Ltd.
 <120> Use of G111 gene
 <130> P2001-179
 <140>
 <141>
 <150> JP 2000-242767
 <151> 2000-8-4
 <152> 22
 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding G111
 <400> 1
 AGACTGCCGC TGGGATGGTT GC 22
 <210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding G111
 <400> 2
 TCDCCTGGAT GDCGCTGGT CA 22
 <210> 3
 <211> 24
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding G111

<400> 3

TTGACGTTGG GATGAAGAAG CAGT 24

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding G111

<400> 4

AATACAGCCC CCAGCCCAAA CCT 23

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding mouse Col2
a1

<400> 5

GCTCATCGCC GCGGTCCTAC G 21

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding mouse Col2
a1

<400> 6

CTGCCAGGT TCGCCAGGAT TG 22

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding human Col2
a1

<400> 7

CCCCGGCACT CCTGGCACTG AT 22

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding human Col2
a1

<400> 8

CTTCGGCACC TCGGGTCCT TTAG 24

<210> 9

65

<211> 3835

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 9

TTGAGGTTGG GATGAGAGAG CAGTGGGAC GGCAGCTGG AGGTCTGCT GGTAGAGGGA 60
 ACTCCAGAGA CTGTGATCC CCAAGACTGA AGGCTGCTT CTGCCACTC TTUUGATGT 120
 TTCTCTTAA GGAAGCTGAA AANXTTATT GATTTCATG ACCAGTTTCT GAGATGAGGG 180
 TTAGAGTCC CTCATCTCTT CCTGAGAGG CCATGTTCAA TCCAATGACT CCGCCACAAG 240
 TCAATAGCTA TGGTAGGCCA TGCTGTCTCC GACCCCTCCA CAGCCAAGGA GTCCCAAGCA 300
 TGGGAACAGA AGGACTTTCT GGTCTGCCCT TTTGCCACCA AGCCAACTTT ATGTCAGGGT 360
 CCCAGGGTTA TGGAGCAGCC AGAGAGACCA GCAGCTGCAC TGAAGGATCT CTCTTTCTCT 420
 CTGCTGCTTC TCCTGGAGT TCAGTCAAA TAACAAAGAA CCGGCTCTC TCAATCTGCT 480
 CCGTTTCTGA TGCCAGCTC GACCTGAAA CCGTAATCCG GACCTCACCC AGCTCCCTGG 540
 TGCTTTTCT CAAGCTCTGG TGTACATCTC CGGCGGTTT CTACGGCCAT CTCTCCATTG 600
 GTACCATGAG CCTTCTTTA GATTTCACAC CTCAGATGAG TCATCAAAAA GGAATTCAC 660
 CTGCTATGG AGTCAGGCC TGTGTTGCAC ATGACTCTAC TCGGGTTCA ATGATGCTTC 720
 ACCCCAGGG CCGGAGCCA CGTGCAACCT GGCAGTGAA GTCAGAGCTG GATATGATGG 780
 TTGGCAAGTG CCGGAGGAC CCTTGGAGG GGGACATGT TAGCCCAAC TCCACAGCCA 840
 CACAGGATCA CTGTTGGGG ATGCTGGATG GGGGGAGGA CTTGGAGAGA GAGGAGAGGC 900
 CTGAGCTGA GTCTGTGTAT GAGACAGACT GCGCTGGGA TGGTTGCAGC CAGGAGTTGG 960
 ATTCCAGGA GCAGCTGGTG CACACATCA ACAGTGAGCA TATCCAGGG GAGCGAAGG 1020
 AATTCTGTG CCATTGGGGA GTTGGTCCA GGGAGCTGAG GCGCTTCAAG CCGCAATACA 1080
 TGTGTGGGT GCATGCGC AGACACAGG GCGAGAAGC ACACAAGTC AGCTTTGAAG 1140
 GCTGTGGGA GTCTATTTCA GCGCTGAAA ACCTCAAGAC GCAGCTTGG TCCACAGCG 1200
 GTGAGAAGC TTACATGTGT GAGCAAGAG GTTGCAGCA GCGCTTTAGC AATGCCAGTG 1260
 ACCCGGCCAA GCACAGAA CTGAGCCACT CCAATGAGAA GGCATACGTG TGCAAGCTCC 1320
 CCGCTGCAC CAAGCTTAC ACAGATCCA GCTGCTGCG CAAACAGCTG AAGACAGTGC 1380
 ATGTTCCGA TGCCAGGTG ACCAGCGGC ATCGAGGGA TGGCTCTTG CACGCGCTC 1440
 AGCCCTCTC CACAGTGGAG CCAAGCGG AAAGGGAAGG AGGATCGGC AGGGAAGAGA 1500
 GCAGACTGAC TGTGCCGAG AGTCCATGC GGCAGCAGG CCGCGAGCG CAGTCTCTT 1560
 GCAGCAGGA CCACTCCCA GCAGGAGTG GGCACACAC GCACAGCGG GTGGAGATGG 1620
 CCGCAACGC CCGGGCAGC ACTGAGGACT TGTCCAGCTT GATGAAGGA CCTTGTGTCT 1680
 CCGCCAGCG ACTCTCAGG CTGCGCGGC TGGAGAAGCT TAGGCTGGAT CAGCTGCATC 1740
 AGCTCGGCC CATAGGTCT CCGGCTCTA AACTGCCAG CTTAAGCCAC GCTGGCTGAC 1800
 CTGTCTCTG CCGTCTGAG CCGCAGTCT CMTGAGCG CCGCAGCAG AGCTCCAGCA 1860
 GCATGAGCTC TGCTTACCA GTCAGCGCA GTCTCTGCT GGCATCCCT TTCCCGCGG 1920
 GAACCCAGC AGAGAATGG GCATGTCAC TACCTGGCT CACACCTGCT CAGCACTACA 1980
 TGCTCGGTC CATATAGCT TCAGCCAGG GAGTGGCAC CCGCCCACT GCAGCTCACA 2040
 GCTGGATCG GATGGAGGT CTTCCTGTC CTCCTGGAG AAGCCGAAC GACTACCGG 2100
 GATACAACCC AATGCAGG GTCATCGA GGGCAGTGA CCGAGCCCG GCTGCTGACC 2160
 AGCCAGCTCC AGCCAGATC CAGGCTTCA AGAGCTGAG ATGTGTGCAC AGGCCCCCTA 2220
 GTGTGGCAAC AGGACGGAAC TTGATCCCC ACCACCTTAC CTCTGTCTAT TCGCCAGGC 2280
 CCGCCAGCAT CACGAAAAAT GTTGCATGG ATACTAGGG GCTACAGGAG GAGCCAGAGG 2340
 TTGGAACTTC CGTATGGGC AATGCTCTG ACCATACAT GGATTTTTC TCCACTGATA 2400
 CTCTGGATA TGGGGACCC GAGGGGACG CAGCTGAGCC TTATGAAGCT AGGGGTCCAG 2460
 GTTCCCTGGC TCTTGGGCT GGTCCACCA CCACTATGG CCTGGCCAC TGTGCCAGC 2520
 AGGTCTCTA TCTGATGCC ACCCCAGAAA ACTGGGGTGA GTTCCCTTCT CATGCTGGG 2580
 TGTACCTAG CAATAAGGT CCGGTGCTG CCAATAGCCA GTGTCTGGA CTGAGCAAT 2640
 ATGACAAAGT GCAGTAAAA CCAGAACAG GTGCCAGT GGGGTCTGAC TCCACCGAT 2700
 TGGACGCTG CTCAATGCC CAGCCAGTG AAGGTTCCG AGGCCGAGC CTCTGTCTT 2760

66

67

68

CACATCATCC CCAGCTCCT CAGCCCCAGT ATCCCCAGTC GGGTCCCTAT CCTCAGCCTC 2820
 CCCATGGTTA TCTCTCAACA GAACCCAGGC TTGGCCTCAA TTTCAAACCC TCCTCCTCTC 2880
 ATTCCACAGC ACAGCTCAAA GCTCAOCTGG TGTGTAATTA CGTTCAGTCG CAGCAGGAAT 2940
 TGTGTGTGGA GGGAGAAAC CCGGGAGGGC TCCCAACCA GGAACCTDCA TACCAGAGCC 3000
 CCAAGTTTCT GGGGGGTTC CAAGTTAGTC AGAGCCCTGC CAAGACCCCA GCAGCAGCGG 3060
 CCGCAGCATA TGGATCTGGC TTTCACCTG CTTCGGCCAA TCACAAATCA GGCTCCTATC 3120
 CTGCCOCTTC ACCCTOCCAT GAACTTTCA CCGTGGGAGT AAACAGGCTT TCCACAGGC 3180
 CAGCAGCACE ACCCTGACTT CTGCCCCGC TGTCCCTTG CTATGGGCC CTCAAGCTGG 3240
 GGGATACCAA CCCAGCTGT GGCATCTTG AGGTGGGCAG GTTAGGAGCA GGCCTTGCT 3300
 TGTACCTCC TCCTGAAGGG CAGGTGTGTA ACGCTCTGGA CTCTCTTGAC CTGGACAACA 3360
 CTCAGCTGGA CTTTGTGGCT ATCTAAGAT AGGCCAGGG CCTGAGCCT CTCTTTTCCC 3420
 ATGAGCAAGG GGACAGCTCT AAAAACACCC CATCTCCCTC TGGGCCCCGC AACATGGCAG 3480
 TGGTAACAT GAGTGTCTTG CTGGGGTCTC TGCCTGGAGA GACACAAATC CTCAACTCTA 3540
 CTGCTAATA GGTAAAGGA CCAAGCAG ATGGTATTTT CTAATGGCT ACATGAGGTG 3600
 CCCAGGGATG CGAGGTTGG GCTGGGGCT GTATT 2635

<210> 10

<211> 1111

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 10

Met Phe Asn Pro Met Thr Pro Pro Gln Val Asn Ser Tyr Gly Gln Pro
 1 5 10 15
 Cys Cys Leu Arg Pro Leu His Ser Gln Gly Val Pro Ser Met Gly Thr
 20 25 30
 Glu Gly Leu Ser Gly Leu Pro Phe Cys His Gln Ala Asn Phe Met Ser
 35 40 45
 Gly Ser Gln Gly Tyr Gly Ala Ala Arg Gln Thr Ser Ser Cys Thr Glu
 50 55 60
 Gly Ser Leu Phe Pro Pro Pro Pro Pro Arg Ser Ser Val Lys Leu
 65 70 75 80
 Thr Lys Lys Arg Ala Leu Ser Ile Ser Pro Leu Ser Asp Ala Ser Leu
 85 90 95
 Asp Leu Gln Thr Val Ile Arg Thr Ser Pro Ser Ser Leu Val Ala Phe
 100 105 110
 Ile Asn Ser Arg Cys Thr Ser Pro Gly Gly Ser Tyr Gly His Leu Ser
 115 120 125
 Ile Gly Thr Met Ser Pro Ser Leu Gly Phe Pro Pro Gln Met Ser His
 130 135 140
 Glu Lys Gly Thr Ser Pro Pro Tyr Gly Val Gln Pro Cys Val Pro His
 145 150 155 160
 Asp Ser Thr Arg Gly Ser Met Met Leu His Pro Gln Ala Arg Gly Pro
 165 170 175
 Arg Ala Thr Cys Gln Leu Lys Ser Glu Leu Asp Met Met Val Gly Lys
 180 185 190
 Cys Pro Glu Asp Pro Leu Glu Gly Asp Met Ser Ser Pro Asn Ser Thr
 195 200 205
 Gly Thr Gln Asn His Leu Leu Gly Met Leu Asp Gly Arg Glu Asp Leu
 210 215 220
 Glu Arg Glu Glu Lys Pro Glu Pro Gln Ser Val Tyr Glu Thr Asp Cys
 225 230 235 240

Arg Trp Asp Gly Cys Ser Gln Glu Phe Asp Ser Gln Glu Gln Leu Val
 245 250 255
 His His Ile Asn Ser Glu His Ile His Gly Glu Arg Lys Glu Phe Val
 260 265 270
 Cys His Trp Gly Gly Cys Ser Arg Glu Leu Arg Pro Phe Lys Ala Gln
 275 280 285
 Tyr Met Leu Val Val His Met Arg Arg His Thr Gly Glu Lys Pro His
 290 295 300
 Lys Cys Thr Phe Glu Gly Cys Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Leu Glu Asn
 305 310 315 320
 Leu Lys Thr His Leu Arg Ser His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Met Cys
 325 330 335
 Glu Gln Glu Gly Cys Ser Lys Ala Phe Ser Asn Ala Ser Asp Arg Ala
 340 345 350
 Lys His Gln Asn Arg Thr His Ser Asn Glu Lys Pro Tyr Val Cys Lys
 355 360 365
 Leu Pro Gly Cys Thr Lys Arg Tyr Thr Asp Pro Ser Ser Leu Arg Lys
 370 375 380
 His Val Lys Thr Val His Gly Pro Asp Ala His Val Thr Lys Arg His
 385 390 395 400
 Arg Gly Asp Gly Pro Leu Pro Arg Ala Gln Pro Leu Ser Thr Val Glu
 405 410 415
 Pro Lys Arg Glu Arg Glu Gly Gly Ser Gly Arg Glu Gln Ser Arg Leu
 420 425 430
 Thr Val Pro Glu Ser Ala Met Pro Gln Gln Ser Pro Gly Ala Gln Ser
 435 440 445
 Ser Cys Ser Ser Asp His Ser Pro Ala Gly Ser Ala Ala Asn Thr Asp
 450 455 460
 Ser Gly Val Glu Met Ala Gly Asn Ala Gly Gly Ser Thr Glu Asp Leu
 465 470 475 480
 Ser Ser Leu Asp Glu Gly Pro Cys Val Ser Ala Thr Gly Leu Ser Thr
 485 490 495
 Leu Arg Arg Leu Glu Asn Leu Arg Leu Asp Gln Leu His Glu Leu Arg
 500 505 510
 Pro Ile Gly Ser Arg Gly Leu Lys Leu Pro Ser Leu Thr His Ala Gly
 515 520 525
 Ala Pro Val Ser Arg Arg Leu Gly Pro Pro Val Ser Leu Asp Arg Arg
 530 535 540
 Ser Ser Ser Ser Ser Met Ser Ser Ala Tyr Thr Val Ser Arg Arg
 545 550 555 560
 Ser Ser Leu Ala Ser Pro Phe Pro Pro Gly Thr Pro Pro Glu Asn Gly
 565 570 575
 Ala Ser Ser Leu Pro Gly Leu Thr Pro Ala Gln His Tyr Met Leu Arg
 580 585 590
 Ala Arg Tyr Ala Ser Ala Arg Gly Ser Gly Thr Pro Pro Thr Ala Ala
 595 600 605
 His Ser Leu Asp Arg Met Gly Gly Leu Ser Val Pro Pro Trp Arg Ser
 610 615 620
 Arg Thr Glu Tyr Pro Gly Tyr Asn Pro Asn Ala Gly Val Thr Arg Arg
 625 630 635 640

Ala Ser Asp Pro Ala Arg Ala Ala Asp His Pro Ala Pro Ala Arg Val
 645 650 655
 Gln Arg Phe Lys Ser Leu Gly Cys Val His Thr Pro Pro Ser Val Ala
 660 665 670
 Thr Gly Arg Asn Phe Asp Pro His His Pro Thr Ser Val Tyr Ser Pro
 675 680 685
 Gln Pro Pro Ser Ile Thr Gln Asn Val Ala Met Asp Thr Arg Gly Leu
 690 695 700
 Gln Gln Gln Pro Gln Val Gly Thr Ser Val Met Gly Asn Gly Leu Asn
 705 710 715 720
 Pro Tyr Met Asp Phe Ser Ser Thr Asp Thr Leu Gly Tyr Gly Gly Pro
 725 730 735
 Glu Gly Thr Ala Ala Gln Pro Tyr Gln Ala Arg Gly Pro Gly Ser Leu
 740 745 750
 Pro Leu Gly Pro Gly Pro Pro Thr Asn Tyr Gly Pro Gly His Cys Ala
 755 760 765
 Gln Gln Val Ser Tyr Pro Asp Pro Thr Pro Gln Asn Trp Gly Gln Phe
 770 775 780
 Pro Ser His Ala Gly Val Tyr Pro Ser Asn Lys Ala Pro Gly Ala Ala
 785 790 795 800
 Tyr Ser Gln Cys Pro Arg Leu Gln His Tyr Gly Gln Val Gln Val Lys
 805 810 815
 Pro Gln Gln Gly Cys Pro Val Gly Ser Asp Ser Thr Gly Leu Ala Pro
 820 825 830
 Cys Leu Asn Ala His Pro Ser Gln Gly Ser Pro Gly Pro Gln Pro Leu
 835 840 845
 Phe Ser His His Pro Gln Leu Pro Gln Pro Gln Tyr Pro Gln Ser Gly
 850 855 860
 Pro Tyr Pro Gln Pro Pro His Gly Tyr Leu Ser Thr Gln Pro Arg Leu
 865 870 875 880
 Gly Leu Asn Phe Asn Pro Ser Ser Ser His Ser Thr Gly Gln Leu Lys
 885 890 895
 Ala Gln Leu Val Cys Asn Tyr Val Gln Ser Gln Gln Gln Leu Leu Trp
 900 905 910
 Gln Gly Arg Asn Arg Gly Gly Leu Pro Asn Gln Gln Leu Pro Tyr Gln
 915 920 925
 Ser Pro Lys Phe Leu Gly Gly Ser Gln Val Ser Gln Ser Pro Ala Lys
 930 935 940
 Thr Pro Ala Ala Ala Ala Ala Tyr Gly Ser Gly Phe Ala Pro Ala
 945 950 955 960
 Ser Ala Asn His Lys Ser Gly Ser Tyr Pro Ala Pro Ser Pro Cys His
 965 970 975
 Gln Thr Phe Thr Val Gly Val Asn Arg Pro Ser His Arg Pro Ala Ala
 980 985 990
 Pro Pro Arg Leu Leu Pro Pro Leu Ser Pro Cys Tyr Gly Pro Leu Lys
 995 1000 1005
 Val Gly Asp Thr Asn Pro Ser Cys Gly His Pro Gln Val Gly Arg Leu
 1010 1015 1020
 Gly Ala Gly Pro Ala Leu Tyr Pro Pro Pro Gln Gly Gln Val Cys Asn
 1025 1030 1035 1040

73

74

Ala Leu Asp Ser Leu Asp Leu Asp Asn Thr Gln Leu Asp Phe Val Ala
 1045 1050 1055
 Ile Leu Asp Glu Ala Gln Gly Leu Ser Pro Pro Leu Ser His Glu Gln
 1060 1065 1070
 Gly Asp Ser Ser Lys Asn Thr Pro Ser Pro Ser Gly Pro Pro Asn Met
 1075 1080 1085
 Ala Val Gly Asn Met Ser Val Leu Leu Gly Ser Leu Pro Gly Glu Thr
 1090 1095 1100
 Gln Phe Leu Asn Ser Ser Ala
 1105 1110
 <210> 11
 <211> 1106
 <212> PRT
 <213> Hussan
 <400> 11
 Met Phe Asn Ser Met Thr Pro Pro Pro Ile Ser Ser Tyr Gly Glu Pro
 1 5 10 15
 Cys Cys Leu Arg Pro Leu Pro Ser Gln Gly Ala Pro Ser Val Gly Thr
 20 25 30

 Glu Gly Leu Ser Gly Pro Pro Phe Cys His Gln Ala Asn Leu Met Ser
 35 40 45
 Gly Pro His Ser Tyr Gly Pro Ala Arg Glu Thr Asn Ser Cys Thr Glu
 50 55 60
 Gly Pro Leu Phe Ser Ser Pro Arg Ser Ala Val Lys Leu Thr Lys Lys
 65 70 75 80
 Arg Ala Leu Ser Ile Ser Pro Leu Ser Asp Ala Ser Leu Asp Leu Gln
 85 90 95
 Thr Val Ile Arg Thr Ser Pro Ser Ser Leu Val Ala Phe Ile Asn Ser
 100 105 110
 Arg Cys Thr Ser Pro Gly Gly Ser Tyr Gly His Leu Ser Ile Gly Thr
 115 120 125
 Met Ser Pro Ser Leu Gly Phe Pro Ala Gln Met Asn His Gln Lys Gly
 130 135 140
 Pro Ser Pro Ser Phe Gly Val Gln Pro Cys Gly Pro His Asp Ser Ala
 145 150 155 160
 Arg Gly Gly Met Ile Pro His Pro Gln Ser Arg Gly Pro Phe Pro Thr
 165 170 175
 Cys Gln Leu Lys Ser Glu Leu Asp Met Leu Val Gly Lys Cys Arg Glu
 180 185 190
 Glu Pro Leu Glu Gly Asp Met Ser Ser Pro Asn Ser Thr Gly Ile Glu
 195 200 205
 Asp Pro Leu Leu Gly Met Leu Asp Gly Arg Glu Asp Leu Glu Arg Glu
 210 215 220
 Glu Lys Arg Glu Pro Glu Ser Val Tyr Glu Thr Asp Cys Arg Trp Asp
 225 230 235 240
 Gly Cys Ser Gln Glu Phe Asp Ser Gln Glu Gln Leu Val His His Ile
 245 250 255
 Asn Ser Glu His Ile His Gly Glu Arg Lys Glu Phe Val Cys His Trp
 260 265 270

75

76

Gly Gly Cys Ser Arg Glu Leu Arg Pro Phe Lys Ala Gln Tyr Met Leu
 275 280 285
 Val Val His Met Arg Arg His Thr Gly Glu Lys Pro His Lys Cys Thr
 290 295 300
 Phe Glu Gly Cys Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Leu Glu Asn Leu Lys Thr
 305 310 315 320
 His Leu Arg Ser His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Met Cys Glu His Glu
 325 330 335

 Gly Cys Ser Lys Ala Phe Ser Asn Ala Ser Asp Arg Ala Lys His Gln
 340 345 350
 Asn Arg Thr His Ser Asn Glu Lys Pro Tyr Val Cys Lys Leu Pro Gly
 355 360 365
 Cys Thr Lys Arg Tyr Thr Asp Pro Ser Ser Leu Arg Lys His Val Lys
 370 375 380
 Thr Val His Gly Pro Asp Ala His Val Thr Lys Arg His Arg Gly Asp
 385 390 395 400
 Gly Pro Leu Pro Arg Ala Pro Ser Ile Ser Thr Val Glu Pro Lys Arg
 405 410 415
 Glu Arg Glu Gly Pro Ile Arg Glu Glu Ser Arg Leu Thr Val Pro
 420 425 430
 Glu Gly Ala Met Lys Pro Gln Pro Ser Pro Gly Ala Gln Ser Ser Cys
 435 440 445
 Ser Ser Asp His Ser Pro Ala Gly Ser Ala Ala Asn Thr Asp Ser Gly
 450 455 460
 Val Glu Met Thr Gly Asn Ala Gly Gly Ser Thr Glu Asp Leu Ser Ser
 465 470 475 480
 Leu Asp Glu Gly Pro Cys Ile Ala Gly Thr Gly Leu Ser Thr Leu Arg
 485 490 495

 Arg Leu Glu Asn Leu Arg Leu Asp Gln Leu His Gln Leu Arg Pro Ile
 500 505 510
 Gly Thr Arg Gly Leu Lys Leu Pro Ser Leu Ser His Thr Gly Thr Thr
 515 520 525
 Val Ser Arg Arg Val Gly Pro Pro Val Ser Leu Glu Arg Arg Ser Ser
 530 535 540
 Ser Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ala Tyr Thr Val Ser Arg Arg Ser Ser
 545 550 555 560
 Leu Ala Ser Pro Phe Pro Pro Gly Ser Pro Pro Glu Asn Gly Ala Ser
 565 570 575
 Ser Leu Pro Gly Leu Met Pro Ala Gln His Tyr Leu Leu Arg Ala Arg
 580 585 590
 Tyr Ala Ser Ala Arg Gly Gly Gly Thr Ser Pro Thr Ala Ala Ser Ser
 595 600 605
 Leu Asp Arg Ile Gly Gly Leu Pro Met Pro Pro Trp Arg Ser Arg Ala
 610 615 620
 Glu Tyr Pro Gly Tyr Asn Pro Asn Ala Gly Val Thr Arg Arg Ala Ser
 625 630 635 640
 Asp Pro Ala Gln Ala Ala Asp Arg Pro Ala Pro Ala Arg Val Gln Arg
 645 650 655

Phe Lys Ser Leu Gly Cys Val His Thr Pro Pro Thr Val Ala Gly Gly
 660 665 670
 Gly Gln Asn Phe Asp Pro Tyr Leu Pro Thr Ser Val Tyr Ser Pro Gln
 675 680 685
 Pro Pro Ser Ile Thr Glu Asn Ala Ala Met Asp Ala Arg Gly Leu Gln
 690 695 700
 Glu Glu Pro Glu Val Gly Thr Ser Met Val Gly Ser Gly Leu Asn Pro
 705 710 715 720
 Tyr Met Asp Phe Pro Pro Thr Asp Thr Leu Gly Tyr Gly Gly Pro Gln
 725 730 735
 Gly Ala Ala Ala Glu Pro Tyr Gly Ala Arg Gly Pro Gly Ser Leu Pro
 740 745 750
 Leu Gly Pro Gly Pro Pro Thr Asn Tyr Gly Pro Asn Pro Cys Pro Gln
 755 760 765
 Glu Ala Ser Tyr Pro Asp Pro Thr Gln Glu Thr Trp Gly Glu Phe Pro
 770 775 780
 Ser His Ser Gly Leu Tyr Pro Gly Pro Lys Ala Leu Gly Gly Thr Tyr
 785 790 795 800

 Ser Glu Cys Pro Arg Leu Glu His Tyr Gly Gln Val Glu Val Lys Pro
 805 810 815
 Glu Gln Gly Cys Pro Val Gly Ser Asp Ser Thr Gly Leu Ala Pro Cys
 820 825 830
 Leu Asn Ala His Pro Ser Glu Gly Pro Pro His Pro Gln Pro Leu Phe
 835 840 845
 Ser His Tyr Pro Gln Pro Ser Pro Pro Gln Tyr Leu Gln Ser Gly Pro
 850 855 860
 Tyr Thr Gln Pro Pro Pro Asp Tyr Leu Pro Ser Glu Pro Arg Pro Cys
 865 870 875 880
 Leu Asp Phe Asp Ser Pro Thr His Ser Thr Gly Gln Leu Lys Ala Gln
 885 890 895
 Leu Val Cys Asn Tyr Val Gln Ser Glu Glu Glu Leu Leu Trp Glu Gly
 900 905 910
 Gly Gly Arg Glu Asp Ala Pro Ala Gln Glu Pro Ser Tyr Gln Ser Pro
 915 920 925
 Lys Phe Leu Gly Gly Ser Gln Val Ser Pro Ser Arg Ala Lys Ala Pro
 930 935 940
 Val Asn Thr Tyr Gly Pro Gly Phe Gly Pro Asn Leu Pro Asn His Lys
 945 950 955 960

 Ser Gly Ser Tyr Pro Thr Pro Ser Pro Cys His Glu Asn Phe Val Val
 965 970 975
 Gly Ala Asn Arg Ala Ser His Arg Ala Ala Ala Pro Pro Arg Leu Leu
 980 985 990
 Pro Pro Leu Pro Thr Cys Tyr Gly Pro Leu Lys Val Gly Gly Thr Asn
 995 1000 1005
 Pro Ser Cys Gly His Pro Glu Val Gly Arg Leu Gly Gly Gly Pro Ala
 1010 1015 1020
 Leu Tyr Pro Pro Pro Glu Gly Gln Val Cys Asn Pro Leu Asp Ser Leu
 1025 1030 1035 1040

Asp Leu Asp Asn Thr Gln Leu Asp Phe Val Ala Ile Leu Asp Glu Pro
 1045 1050 1055
 Gln Gly Leu Ser Pro Pro Pro Ser His Asp Gln Arg Gly Ser Ser Gly
 1060 1065 1070
 His Thr Pro Pro Pro Ser Gly Pro Pro Asn Met Ala Val Gly Asn Met
 1075 1080 1085
 Ser Val Leu Leu Arg Ser Leu Pro Gly Glu Thr Glu Phe Leu Asn Ser
 1090 1095 1100

Ser Ala

1105

<210> 12

<211> 3600

<212> DNA

<213> Human

<400> 12

ccagacac accccaggac cggcatccc gagccacag cccagacaga ggtcccacc 60
 accctccctt gaggcccat gttcaactcg atgacccac caaccatcag tagctatggc 120
 gagactgct gtcctggcc cctcccagt caggaggccc ccagtggtg gacagaagga 180
 ctgtctggcc cgccttcig ccacacagct aactcatgt ccggcccca cagtatggg 240
 ccggccagag agccacacag ctgcacagag ggcacactt ttctctccc ccggagtga 300
 gtcnagtga ccaggaagcg ggcactgtc atctacctc tgcggagtc cagccaggac 360
 ctgcagagcg ttatccgac ctacccacag tccccttag ctctatcaa ctgcagatg 420
 aactctccag gaggctcctt cgttactc tcacttggc ccatgagccc atctctggg 480
 ttccacgcc agatgacta ccaaaaagg cctctgctt ccttggggt ccagcttgi 540
 ggtcccctt actctgccc ggttggatg atccncaic ctacgtccg gggaccttc 600
 ccacttgcg agctgaagtc tggcaggac atgttgttg gcaagtcgc ggggaaccc 660
 ttggagggtg atgtctcag cccactcc acaggctac aggtccctt gttgggtg 720
 ctgggtggc gggaggaat cggagagag ggaagcgig agctgaatc tgtgtatga 780
 acgaatgct gttggatgg ctgcagtcg gatttggct cccagagga gcctgtgac 840
 cactatcaca gggagcat ctacggggg cgggaagag tctgtgcca ctggagggc 900
 tgcctcagg agctaggcc ctccaagcc cagtacatg tgggtgtc caigccaga 960
 cactctggc agagccaca cagtgacg ttggaggtt ggcgaagtc atactcagc 1020
 ctggaacac tggagagca ttgtgtgta ccaagggtg agagccata ctgtgtgag 1080
 caggagggtt gctgaagc ctccagaa ggcagtga cggccagca ccgaatcga 1140
 accatctca atgagagct gtagttagt agctctctg gctccacaa aggtatana 1200
 gactctgct cgcctgcaa acatgtcag atgtgtctg gtccagcgc ccatgtgac 1260
 aacggggacc gtgggtgtg cccctgctt cgggcacat ccttcttac agtggagcc 1320
 aagggggag gggagggag tccatcagg gaggaaaga gactgctgt gccagaggt 1380
 gcatgaagc cagagccag cctggggcc cagctctct gacagagga ccctcccg 1440
 gcaggagtg cagccaatc agccaggtt gtggaaatg ctggcaatg aggggggc 1500
 actgaagac tctcagctt ggaagagga cttgtatg ctggcctg tctctact 1560
 ctccgctg ttgaacat caggttgac cagctatc aactcggcc aatagggac 1620
 cgggtctca acatgcacg ctgtccac accggaaac ctgtgtccg ccgctgtgg 1680
 cccctgct ctctgagc ccgacagc agctcagca gcacagctc tgcctatac 1740
 gtccgctg gctctctct ggtctctct ttccctctg gctccccc agagaatga 1800
 gactctccc tgcctggct tatgctgac cagcactac tgcctcagg agaatgt 1860
 tcagccagag ggtgtgtac ttgcctctt gacgctcc gcttgatg gtaggtgt 1920
 ctccctgct ctctgtgag aagccagac gattatcag gataacac caatgcagg 1980
 gtccacagga gggcagtg cccagccag gctgtgac gtccgtct agctagatc 2040
 cagaggttca aggcctgg ctgtgtcat accacacac ctgtgggag gggagagc 2100

81

82

aactttagtc cttaactcc aactctgtc tactcaacc agcccccag caiaacigag 2160
 aatgttgcca tggatgtag agggctacag gaagagctag aagtgggac ctcatggig 2220
 ggcagtggc igaaccctta tatggacttc ccacctacg atactctggg atatgggaga 2280
 ccgaagggg cagcagctga gcttatgga gagaggggic caggtctct gctcttggg 2340
 ccigtccac ccaccaacta iggcacnac ccigtccc agcaggctc atactctgac 2400
 ccacccaag aactatggg igtgttccct tccactctg ggcgtacac aggcacnac 2460
 gcctagggg gaactacag ccagtgtct cgccttgac atatgggac agtgcagtc 2520
 aggcagaac aggggtgccc agtgggtct gactcacag gacggcacc ctgcctaat 2580
 gccacccca gtggggggc ccacatcca cagctctct ttcccaata cctccagccc 2640
 tctccccc aatactcca gtcaggccc tatccacgc caccctctg ttaactct 2700
 ttagaacca ggccttgcc agacttgat tcccacacp atccacagg gcagctcaag 2760
 gctagcttg igtgaatta tgttactat caacgggagc tactgtgga agtggggc 2820
 agggagagc cctccccc ggaacctcc taccagagc ccagttct ggggggtcc 2880
 caggttgcc ccagcggc taagctcca gtgaacac atggacctg cttggaccc 2940
 aacttgcca atcagagc agttccat ccacccctt acctatgca tgaataatt 3000
 gtatggggg caaataggc ttacatagg gcagcagac cactctgac tctccccc 3060
 tggccactt gctatggcc tctcaagc ggaagcaca cccccagct tggctact 3120
 gactggggg gctaggagc ggtctgct tttacctc ctccagagc acagtgat 3180
 aactccctg actctctga tcttgacac actagctg ccttggtg tctctgac 3240
 ggcacccag gctagctc tctctctc ctgtctg gggcagctc tgaactcc 3300
 ccactccct ctggccccc caactgct gtggcaca tgaatgct actgagctc 3360
 ctactggg anacagat cctcaactc agtgcata gactaggga tctatcat 3420
 cactagctc attctaat ggtttctc cttccagac aaatgggg agtgcagtc 3480
 cctgcaca gatgcacag ggaaggagc tatgggtg ggcctatga tagctgtat 3540
 agtttgag gagaattg ataatgac tgttctga taataaggc acgctatg 3600

<219> 13

<211> 1106

<212> PRT

<213> Human

<400> 13

Met Phe Asn Ser Met Thr Pro Pro Pro Ile Ser Ser Tyr Gly Glu Pro

1 5 10 15

Cys Cys Leu Arg Pro Leu Pro Ser Gln Gly Ala Pro Ser Val Gly Thr

20 25 30

Glu Gly Leu Ser Gly Pro Pro Phe Cys His Gln Ala Asn Leu Met Ser

35 40 45

Gly Pro His Ser Tyr Gly Pro Ala Arg Glu Thr Asn Ser Cys Thr Glu

50 55 60

Gly Pro Leu Phe Ser Ser Pro Arg Ser Ala Val Lys Leu Thr Lys Lys

65 70 75 80

Arg Ala Leu Ser Ile Ser Pro Leu Ser Asp Ala Ser Leu Asp Leu Gln

85 90 95

Thr Val Ile Arg Thr Ser Pro Ser Ser Leu Val Ala Phe Ile Asn Ser

100 105 110

Arg Cys Thr Ser Pro Gly Gly Ser Tyr Gly His Leu Ser Ile Gly Thr

115 120 125

Met Ser Pro Ser Leu Gly Phe Pro Ala Gln Met Asn His Gln Lys Gly

130 135 140

Pro Ser Pro Ser Phe Gly Val Gln Pro Cys Gly Pro His Asp Ser Ala

83			84
145	150	155	160
Arg Gly Gly Met Ile Pro His Pro Gln Ser Arg Gly Pro Phe Pro Thr			
	165	170	175
Cys Gln Leu Lys Ser Glu Leu Asp Met Leu Val Gly Lys Cys Arg Glu			
	180	185	190
Glu Pro Leu Glu Gly Asp Met Ser Ser Pro Asn Ser Thr Gly Ile Gln			
	195	200	205
Asp Pro Leu Leu Gly Met Leu Asp Gly Arg Glu Asp Leu Glu Arg Glu			
	210	215	220
Glu Lys Arg Glu Pro Glu Ser Val Tyr Glu Thr Asp Cys Arg Trp Asp			
	225	230	235
Gly Cys Ser Gln Glu Phe Asp Ser Glu Glu Gln Leu Val His His Ile			
	245	250	255
Asn Ser Glu His Ile His Gly Glu Arg Lys Glu Phe Val Cys His Trp			
	260	265	270
Gly Gly Cys Ser Arg Glu Leu Arg Pro Phe Lys Ala Gln Tyr Met Leu			
	275	280	285
Val Val His Met Arg Arg His Thr Gly Glu Lys Pro His Lys Cys Thr			
	290	295	300
Phe Glu Gly Cys Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Leu Glu Asn Leu Lys Thr			
	305	310	315
His Leu Arg Ser His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Met Cys Gln His Glu			
	325	330	335
Gly Cys Ser Lys Ala Phe Ser Asn Ala Ser Asp Arg Ala Lys His Glu			
	340	345	350
Asn Arg Thr His Ser Asn Glu Lys Pro Tyr Val Cys Lys Leu Pro Gly			
	355	360	365
Cys Thr Lys Arg Tyr Thr Asp Pro Ser Ser Leu Arg Lys His Val Lys			
	370	375	380
Thr Val His Gly Pro Asp Ala His Val Thr Lys Arg His Arg Gly Asp			
	385	390	395
Gly Pro Leu Pro Arg Ala Pro Ser Ile Ser Thr Val Glu Pro Lys Arg			
	405	410	415
Glu Arg Glu Gly Gly Pro Ile Arg Glu Glu Ser Arg Leu Thr Val Pro			
	420	425	430
Glu Gly Ala Met Lys Pro Gln Pro Ser Pro Gly Ala Glu Ser Ser Cys			
	435	440	445
Ser Ser Asp His Ser Pro Ala Gly Ser Ala Ala Asn Thr Asp Ser Gly			
	450	455	460
Val Glu Met Thr Gly Asn Ala Gly Gly Ser Thr Glu Asp Leu Ser Ser			
	465	470	475
Leu Asp Glu Gly Pro Cys Ile Ala Gly Thr Gly Leu Ser Thr Leu Arg			
	485	490	495
Arg Leu Glu Asn Leu Arg Leu Asp Gln Leu His Gln Leu Arg Pro Ile			
	500	505	510
Gly Thr Arg Gly Leu Lys Leu Pro Ser Leu Ser His Thr Gly Thr Thr			
	515	520	525
Val Ser Arg Arg Val Gly Pro Pro Val Ser Leu Glu Arg Arg Ser Ser			

85														
530					535					540				
Ser	Ser	Ser	Ser	Ile	Ser	Ser	Ala	Tyr	Thr	Val	Ser	Arg	Arg	Ser
545					550					555				560
Leu	Ala	Ser	Pro	Phe	Pro	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Glu	Asn	Gly	Ala
					565					570				575
Ser	Leu	Pro	Gly	Leu	Met	Pro	Ala	Gln	His	Tyr	Leu	Leu	Arg	Ala
					580					585				590
Tyr	Ala	Ser	Ala	Arg	Gly	Gly	Gly	Thr	Ser	Pro	Thr	Ala	Ala	Ser
					595					600				
Leu	Asp	Arg	Ile	Gly	Gly	Leu	Pro	Met	Pro	Pro	Trp	Arg	Ser	Arg
					610					620				Ala
Glu	Tyr	Pro	Gly	Tyr	Asn	Pro	Asn	Ala	Gly	Val	Thr	Arg	Arg	Ala
625					630					635				640
Asp	Pro	Ala	Gln	Ala	Ala	Asp	Arg	Pro	Ala	Pro	Ala	Arg	Val	Gln
					645					650				655
Phe	Lys	Ser	Leu	Gly	Cys	Val	His	Thr	Pro	Pro	Thr	Val	Ala	Gly
					660					665				670
Gly	Gln	Asn	Phe	Asp	Pro	Tyr	Leu	Pro	Thr	Ser	Val	Tyr	Ser	Pro
					675					680				685
Pro	Pro	Ser	Ile	Thr	Glu	Asn	Ala	Ala	Met	Asp	Ala	Arg	Gly	Leu
					690					700				Gln
Glu	Glu	Pro	Gln	Val	Gly	Thr	Ser	Met	Val	Gly	Ser	Gly	Leu	Asn
705					710					715				720
Tyr	Met	Asp	Phe	Pro	Pro	Thr	Asp	Thr	Leu	Gly	Tyr	Gly	Gly	Pro
					725					730				735
Gly	Ala	Ala	Ala	Glu	Pro	Tyr	Gly	Ala	Arg	Gly	Pro	Gly	Ser	Leu
					740					745				750
Leu	Gly	Pro	Gly	Pro	Pro	Thr	Asn	Tyr	Gly	Pro	Asn	Pro	Cys	Pro
					755					760				765
Glu	Ala	Ser	Tyr	Pro	Asp	Pro	Thr	Gln	Gln	Thr	Trp	Gly	Glu	Phe
					770					775				780
Ser	His	Ser	Gly	Leu	Tyr	Pro	Gly	Pro	Lys	Ala	Leu	Gly	Gly	Thr
785					790					795				800
Ser	Gln	Cys	Pro	Arg	Leu	Gln	His	Tyr	Gly	Gln	Val	Gln	Val	Lys
					805					810				815
Glu	Gln	Gly	Cys	Pro	Val	Gly	Ser	Asp	Ser	Thr	Gly	Leu	Ala	Pro
					820					825				830
Leu	Asn	Ala	His	Pro	Ser	Glu	Gly	Pro	Pro	His	Pro	Gln	Pro	Leu
					835					840				845
Ser	His	Tyr	Pro	Gln	Pro	Ser	Pro	Pro	Gln	Tyr	Leu	Gln	Ser	Gly
					850					855				860
Tyr	Thr	Gln	Pro	Pro	Pro	Asp	Tyr	Leu	Pro	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro
					865					870				875
Leu	Asp	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	His	Ser	Thr	Gly	Gln	Leu	Lys	Ala

Lys Phe Leu Gly Gly Ser Gln Val Ser Pro Ser Arg Ala Lys Ala Pro
 930 935 940
 Val Asn Thr Tyr Gly Pro Gly Phe Gly Pro Asn Leu Pro Asn His Lys
 945 950 955 960
 Ser Gly Ser Tyr Pro Thr Pro Ser Pro Cys His Glu Asn Phe Val Val
 965 970 975
 Gly Ala Asn Arg Ala Ser His Arg Ala Ala Ala Pro Pro Arg Leu Leu
 980 985 990

Pro Pro Leu Pro Thr Cys Tyr Gly Pro Leu Lys Val Gly Gly Thr Asn
 995 1000 1005
 Pro Ser Cys Gly His Pro Glu Val Gly Arg Leu Gly Gly Gly Pro Ala
 1010 1015 1020
 Leu Tyr Pro Pro Pro Glu Gly Gln Val Cys Asn Pro Leu Asp Ser Leu
 1025 1030 1035 1040
 Asp Leu Asp Asn Thr Gln Leu Asp Phe Val Ala Ile Leu Asp Glu Pro
 1045 1050 1055
 Gln Gly Leu Ser Pro Pro Pro Ser His Asp Glu Arg Gly Ser Ser Gly
 1060 1065 1070
 His Thr Pro Pro Pro Ser Gly Pro Pro Asn Met Ala Val Gly Asn Met
 1075 1080 1085
 Ser Val Leu Leu Arg Ser Leu Pro Gly Glu Thr Glu Phe Leu Asn Ser
 1090 1095 1100
 Ser Ala
 1105
 <210> 14
 <211> 3600
 <212> DNA
 <213> Human

<400> 14

ccagactac agccctggac ccgcctccc ggcctccag ccagacaga gtgctccac 60
 accctctct gaggccct gttcaactag atgacccac caccacacag tagctatgg 120
 ggcctctgt gctccggcc cctccctagt caggggccc ccagtgtgg gcacagagga 180
 ctgtctggc cgcctctct cccacacgt accctcgtt cggccccc dagtctatgg 240
 ccgcctcag agccacacag ctgcacagag ggcctactt ttctctctc caggatgca 300
 gtcacgtga ccagagagc agcctgttcc atctccttc tgcagatgc cagctggac 360
 ctgcacagg ttatccac ctcacccagc tccctctag ctctctcct ctgcctatgc 420
 acctctccg gaggctcct cgtctctct tcccttgga ccctgagcc ctctctgga 480
 ttccacccc agatgaatc ccacacagc cctctcctt ccttggtgt ccagcttgt 540
 ggctccatg cctctctcc ggttggttg atccacatc ctctctccg ggcctcttc 600
 ccaccttgc agctgaatc tgcctggac atctctgtt gcacgttcc ggcagaccc 660
 ttggaggtg atctctccg cccacctcc accgctatc aggtctctt gtgggttg 720
 ctgctgggc ggcagacct ccagagagc ggcagcgtg agctgaatc tctctatga 780
 actgcttgc gtgggttg ctgcacccg gattttgact cccagagca gctgttgc 840
 cactcaca ggcagcct cccagggag cggagaggt tctgttcc ctgagggc 900
 tctctcagg agctggcc ctccacgc cagctatgc tctgttcc cagctcaga 960
 caccctggc agagacac cagctcagc ttggaggtt ggcagagtc atctcagc 1020
 ctgagacac tgcagacac ctgaggtc caccgggtg agagacac cagctgtg 1080
 cagaggtgt ggcagacac ctccagac cccaggtg ggcagacac cagaggtg 1140

89

90

aacacatcca atgagaagcc gtaigtatgi nagtccctg gctgcacaa angelataca 1200
 gctccatgcl cgcigugaaa acatgtaag acagtgcag gidctgacgc ccaigtgacc 1260
 aaagggcacc gtgaggatgg cccctggcc cgggacccat ccattctac agtggagcc 1320
 aagaggagag gggagaggag tccalcagg gggaaagca gacfgacgt gccagagggt 1380
 gccatgaag cacagccag cctggggcc cagtcctct gcagcagiga cactccccc 1440
 gcaggagag cagcaatag agacagtgt gtggaatga ctggcattg agggagcagc 1500
 actgagacc tcctcagct ggcagaggga ccttgcatt ctggcattg tcgtccact 1560
 ctccgcgcc ttgagaacct caggttggc cagctacat aactccggc antaggagc 1620
 cgggagctm aactgcagg ctgttccac accgttacc ctgttccg ccggcaggc 1680
 ccccgagct ctctgagc cgcagcagc agctcagca gcacagcgc tgcctatct 1740
 gtcagcgcc gcctcctct ggctcctct tcccccctg gctccacc agagaaagc 1800
 gcatctccc tgcctggct taigcctgc cagcactac tgcctggga agatagct 1860
 tgcgcagag aggttgatg ttgcctact gcagcagca gctggatgc gataggtgt 1920
 ctccctgct ctccctggg agcagagcc gactatccg gatacacc ccaagcagg 1980
 gtaaccagga gggcagtg accagcccg gcgttgacc gtcctgctc agctagagtc 2040
 cagagtgca agagcctgg ctgtgctat acccaccac ctgtggcag gggagagag 2100
 aacttgatg ctacccagc aactctgtc taccacac agcccccag cactactgag 2160
 anigtgcga tggatgctg aggtctatg gaagagccag aagltggac ctccatggt 2220
 ggcagtggc tgaacccct taigcactc ccacactg atactctgg atatgggga 2280
 actgaaggg cagcagtg gccttatga gcaggggtc cagcctoi gcctctggg 2340
 ctgtgctac caccacata tggcctaac ccgtctcc agcgggctc atactgac 2400
 cccaccagc aacacaggg tggatccct tccactcig ggcgtacc agcccccag 2460
 gctataggg gacctatag ccagtgtct cgaclgaac atiaaggac agtgcagtc 2520
 aagctagac aggggtgccc agtgggtct gactccagc gactggccc ctgctcact 2580
 gccacccca gtgagggccc cccacccc cagctctct tttccatta ccccccagc 2640
 tctccccc antatctca gtccggccc taccaccag ccccccga ttatctct 2700
 tgcagccca ggcctggct ggccttgc tcccccac atccacagc ggcctcag 2760
 gctcagctg tgtgactta tctcactoi caccagagc tactgtggc ggtggggc 2820
 agggagagc ccccgccc ggaacctcc taccagagc ccaagtctc aggggttc 2880
 caggttgcg caagcagtc taagcctca gtaacacat atggacagc ctgtgacc 2940
 aacttgcga atcaggagc aggttctct cccacccct cactatgca tgaacttt 3000
 gtgtggggc caatagggc ttcctatag ggcagagac cactctgact tcgcccac 3060
 ttgctacti gctatggc tctcaagtg ggggcacaa acccagctg tggctact 3120
 ggtgtggca ggtaggagc ggtctgac ttgacccc ccccgaggc aggtatgt 3180
 aacccctgg actctctga tctgacac actcagcagc acttgagc tctctggt 3240
 aggcacagc ggtgagtc tctctctc actgacagc ggggcagctc tggacatcc 3300
 cccctctct ctgggcccc cactgtgct ggggcacaa tgggtctct actgagatc 3360
 ctactgggg aacagacat cctcactct agtgcctaa ggtagggaa tctctctct 3420
 cactgagc attctcag aggttctat cctccagac aactggggc agctcagtc 3480
 cctgcacaa gctgcacag ggtaggagc tatggctgg ggtatgta tctctgtat 3540
 actgttggc gagaattg ataatgac tgttctga taatagga actgacag 3600

<210> 15

<211> 1106

<212> PRT

<213> Human

<400> 15

Met Phe Asn Ser Met Thr Pro Pro Ile Ser Ser Tyr Gly Glu Pro

1 5 10 15

Cys Cys Leu Arg Pro Leu Pro Ser Glu Gly Ala Pro Ser Val Gly Thr

20 25 30

91																	
Glu	Gly	Leu	Ser	Gly	Pro	Pro	Phe	Cys	His	Gln	Ala	Asn	Leu	Met	Ser		
35						40						45					
Gly	Pro	His	Ser	Tyr	Gly	Pro	Ala	Arg	Glu	Thr	Asn	Ser	Cys	Thr	Glu		
50			55			60											
Gly	Pro	Leu	Phe	Ser	Ser	Pro	Arg	Ser	Ala	Val	Lys	Leu	Thr	Lys	Lys		
65			70			75						80					
Arg	Ala	Leu	Ser	Ile	Ser	Pro	Leu	Ser	Asp	Ala	Ser	Leu	Asp	Leu	Gln		
85						90						95					
Thr	Val	Ile	Arg	Thr	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Val	Ala	Phe	Ile	Asn	Ser		
100						105						110					
Arg	Cys	Thr	Ser	Pro	Gly	Gly	Ser	Tyr	Gly	His	Leu	Ser	Ile	Gly	Thr		
115			120			125											
Met	Ser	Pro	Ser	Leu	Gly	Phe	Pro	Ala	Gln	Met	Asn	His	Gln	Lys	Gly		
130			135			140											
Pro	Ser	Pro	Ser	Phe	Gly	Val	Gln	Pro	Cys	Gly	Pro	His	Asp	Ser	Ala		
145			150			155						160					
Arg	Gly	Gly	Met	Ile	Pro	His	Pro	Gln	Ser	Arg	Gly	Pro	Phe	Pro	Thr		
165						170						175					
Cys	Gln	Leu	Lys	Ser	Glu	Leu	Asp	Met	Leu	Val	Gly	Lys	Cys	Arg	Glu		
180			185			190											
Glu	Pro	Leu	Glu	Gly	Asp	Met	Ser	Ser	Pro	Asn	Ser	Thr	Gly	Ile	Gln		
195			200			205											
Asp	Pro	Leu	Leu	Gly	Met	Leu	Asp	Gly	Arg	Glu	Asp	Leu	Glu	Arg	Glu		
210			215			220											
Glu	Lys	Arg	Glu	Pro	Gln	Ser	Val	Tyr	Glu	Thr	Asp	Cys	Arg	Trp	Asp		
225			230			235						240					
Gly	Cys	Ser	Gln	Glu	Phe	Asp	Ser	Gln	Glu	Gln	Leu	Val	His	His	Ile		
245			250			255											
Asn	Ser	Glu	His	Ile	His	Gly	Glu	Arg	Lys	Glu	Phe	Val	Cys	His	Trp		
260			265			270											
Gly	Gly	Cys	Ser	Arg	Glu	Leu	Arg	Pro	Phe	Lys	Ala	Gln	Tyr	Met	Leu		
275			280			285											
Val	Val	His	Met	Arg	Arg	His	Thr	Gly	Glu	Lys	Pro	His	Lys	Cys	Thr		
290			295			300											
Phe	Glu	Gly	Cys	Arg	Lys	Ser	Tyr	Ser	Arg	Leu	Glu	Asn	Leu	Lys	Thr		
305			310			315						320					
His	Leu	Arg	Ser	His	Thr	Gly	Glu	Lys	Pro	Tyr	Met	Cys	Gln	His	Glu		
325			330			335											
Gly	Cys	Ser	Lys	Ala	Phe	Ser	Asn	Ala	Ser	Asp	Arg	Ala	Lys	His	Gln		
340			345			350											
Asn	Arg	Thr	His	Ser	Asn	Glu	Lys	Pro	Tyr	Val	Cys	Lys	Leu	Pro	Gly		
355			360			365											
Cys	Thr	Lys	Arg	Tyr	Thr	Asp	Pro	Ser	Ser	Leu	Arg	Lys	His	Val	Lys		
370			375			380											
Thr	Val	His	Gly	Pro	Asp	Ala	His	Val	Thr	Lys	Arg	His	Arg	Gly	Asp		
385			390			395											

93

94

Glu Arg Glu Gly Gly Pro Ile Arg Glu Glu Ser Arg Leu Thr Val Pro
 420 425 430
 Glu Gly Ala Met Lys Pro Gln Pro Ser Pro Gly Ala Gln Ser Ser Cys
 435 440 445
 Ser Ser Asp His Ser Pro Ala Gly Ser Ala Ala Asn Thr Asp Ser Gly
 450 455 460
 Val Glu Met Thr Gly Asn Ala Gly Gly Ser Thr Glu Asp Leu Ser Ser
 465 470 475 480
 Leu Asp Glu Gly Pro Cys Ile Ala Gly Thr Gly Leu Ser Thr Leu Arg
 485 490 495
 Arg Leu Glu Asn Leu Arg Leu Asp Gln Leu His Gln Leu Arg Pro Ile
 500 505 510
 Gly Thr Arg Gly Leu Lys Leu Pro Ser Leu Ser His Thr Gly Thr Thr
 515 520 525
 Val Ser Arg Arg Val Gly Pro Pro Val Ser Leu Glu Arg Arg Ser Ser
 530 535 540
 Ser Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ala Tyr Thr Val Ser Arg Arg Ser Ser
 545 550 555 560
 Leu Ala Ser Pro Phe Pro Pro Gly Ser Pro Pro Glu Asn Gly Ala Ser
 565 570 575
 Ser Leu Pro Gly Leu Met Pro Ala Gln His Tyr Leu Leu Arg Ala Arg
 580 585 590
 Tyr Ala Ser Ala Arg Gly Gly Gly Thr Ser Pro Thr Ala Ala Ser Ser
 595 600 605
 Leu Asp Arg Ile Gly Gly Leu Pro Met Pro Pro Trp Arg Ser Arg Ala
 610 615 620
 Glu Tyr Pro Gly Tyr Asn Pro Asn Ala Gly Val Thr Arg Arg Ala Ser
 625 630 635 640
 Asp Pro Ala Gln Ala Ala Asp Arg Pro Ala Pro Ala Arg Val Gln Arg
 645 650 655
 Phe Lys Ser Leu Gly Cys Val His Thr Pro Pro Thr Val Ala Gly Gly
 660 665 670
 Gly Gln Asn Phe Asp Pro Tyr Leu Pro Thr Ser Val Tyr Ser Pro Gln
 675 680 685
 Pro Pro Ser Ile Thr Glu Asn Ala Ala Met Asp Ala Arg Gly Leu Gln
 690 695 700
 Glu Glu Pro Gln Val Gly Thr Ser Met Val Gly Ser Gly Leu Asn Pro
 705 710 715 720

 Tyr Met Asp Phe Pro Pro Thr Asp Thr Leu Gly Tyr Gly Gly Pro Gln
 725 730 735
 Gly Ala Ala Ala Glu Pro Tyr Gly Ala Arg Gly Pro Gly Ser Leu Pro
 740 745 750
 Leu Gly Pro Gly Pro Pro Thr Asn Tyr Gly Pro Asn Pro Cys Pro Gln
 755 760 765
 Gln Ala Ser Tyr Pro Asp Pro Thr Gln Gln Thr Trp Gly Glu Phe Pro
 770 775 780
 Ser His Ser Gly Leu Tyr Pro Gly Pro Lys Ala Leu Gly Gly Thr Tyr
 785 790 795 800
 Ser Gln Cys Pro Arg Leu Glu His Tyr Gly Gln Val Gln Val Lys Pro

95

96

805 810 815
 Glu Gln Gly Cys Pro Val Gly Ser Asp Ser Thr Gly Leu Ala Pro Cys
 820 825 830
 Leu Asn Ala His Pro Ser Gln Gly Pro Pro His Pro Gln Pro Leu Phe
 835 840 845
 Ser His Tyr Pro Gln Pro Ser Pro Pro Gln Tyr Leu Gln Ser Gly Pro
 850 855 860
 Tyr Thr Gln Pro Pro Pro Asp Tyr Leu Pro Ser Glu Pro Arg Pro Cys
 865 870 875 880

Leu Asp Phe Asp Ser Pro Thr His Ser Thr Gly Gln Leu Lys Ala Gln
 885 890 895
 Leu Val Cys Asn Tyr Val Gln Ser Gln Gln Gln Leu Leu Trp Glu Gly
 900 905 910
 Gly Gly Arg Glu Asp Ala Pro Ala Gln Glu Pro Ser Tyr Gln Ser Pro
 915 920 925
 Lys Phe Leu Gly Glu Ser Gln Val Ser Pro Ser Arg Ala Lys Ala Pro
 930 935 940
 Val Asn Thr Tyr Gly Pro Gly Phe Gly Pro Asn Leu Pro Asn His Lys
 945 950 955 960
 Ser Gly Ser Tyr Pro Thr Pro Ser Pro Cys His Glu Asn Phe Val Val
 965 970 975
 Gly Ala Asn Arg Ala Ser His Arg Ala Ala Ala Pro Pro Arg Leu Leu
 980 985 990
 Pro Pro Leu Pro Thr Cys Tyr Gly Pro Leu Lys Val Gly Gly Thr Asn
 995 1000 1005
 Pro Ser Cys Gly His Pro Glu Val Gly Arg Leu Gly Gly Gly Pro Ala
 1010 1015 1020
 Leu Tyr Pro Pro Pro Glu Gly Gln Val Cys Asn Pro Leu Asp Ser Leu
 1025 1030 1035 1040
 Asp Leu Asp Asn Thr Glu Leu Asp Phe Val Ala His Leu Asp Glu Pro
 1045 1050 1055
 Gln Gly Leu Ser Pro Pro Pro Ser His Asp Gln Arg Gly Ser Ser Gly
 1060 1065 1070
 His Thr Pro Pro Pro Ser Gly Pro Pro Asn Met Ala Val Gly Asn Met
 1075 1080 1085
 Ser Val Leu Leu Arg Ser Leu Pro Gly Glu Thr Glu Phe Leu Asn Ser
 1090 1095 1100

Ser Ala

1105

<210> 16

<211> 3600

<212> DNA

<213> Human

<400> 16

ccagacacac agccctggac agccatccc gaggccagag ccagacaga gtgccccac 60
 acctctctct gaggcccat gttaactcg atgacccac caccacacag tagctatgga 120
 gaggctgcti gtcctgggc cctcccagt caggggccc ccagtgtgg gacagagga 180
 ctgtctggcc cgcctctcig ccacacagct aactctatgt caggccccc cagttaigga 240
 ccagccagag agacccacag ctgacccag ggctccactct ttctctctcc ccggagiga 300

gicagagiga cnaagagagc ggcartgic aictonecto igteggatgc cagcctggac 360
 cignagaggg iintergenc ctoaccacag teoctegtag cttcatona ctogrgsigc 420
 acatctcag gaggcicla aggcacila tccattggca ccatgagccc atcistggga 480
 tteccagccc agatgaica ccaaaaagg cccctggctf ccttgggggt ccagocitgt 540
 gutcccaig acicigccc ggttgggatg atccacate ctcagtccc gggcccttc 600
 cnaactgce agcignagla tgagtggac aigtgtgtg gcaagtccc gagggaaccc 660
 ttggaaggig atagtccag ccccaacicc acaggcatac aggaicccc gtgggggatg 720
 ctggatgggc gggaggact cagagagag gagaaggcig agcctgaate tgtgatgaa 780
 acigactgce gtgggatgg ctgagccag gaaittgaet cccagagcca gctggtagac 840
 cactacaca gcaagcaat cccggggag cgaaggagt tctgtgcca ctgggggggc 900
 tgcacaggg agctgagcc cttcaagcc caglacatgc tgggtggica catgcccaga 960
 cactatggc agagccaca cagtgagcc ttggaagggt gccgaagtc atactacgc 1020
 ctgcaacccc tgaagaccca cciggggla cacaagggtg agagccata cagtgtgag 1080
 cccggaggt gcagtgaagc cticagcaat gccagigacc gacccaagca ccgaatcgg 1140
 accaictca atgagagcc gtagttagt aagctccctg gctgaccaa ccgctiacn 1200
 gactctagct cgtgagaaa acatgtcaag acagtgcatg gtccigagcc ccatgtgac 1260
 aaagggcacc gtaggagtg cccctggct cgggacccat ccattctac agtggagccc 1320
 cagagagagc gggaggagc lcccaicag gaggaaagca gactgaactt gacagaggt 1380
 gccatgagc cagagccag ccttgggac cagtcctcc gcagcagiga cactccccc 1440
 gcagggagtg cagccatac agcagtgtt gtagaatga ctggcaatgc agggggcagc 1500
 actgaagac ctccagcti ggcagggga cctgcattg ctggcattg tctgacatt 1560
 cttingccgc itgagaccci caggctggac cagttacatc aactccggcc aaataggac 1620
 cggggtctca aactgccag ctgtgccac accggtaaca ctgtgcccgc ccggtgggc 1680
 cccacagct ccttgagc cccagcagc agctccaga gcatcagtc tgcctact 1740
 gtagggccc gctctccct ggcctctct tteccctc gctccccc agagantga 1800
 gactctccc tgcctggct tctgctgccc cagccatac tgcctgggc agalatgt 1860
 tccgacagc ggggtgtgac ttcgcccct gacgcatcca gctggagc gatagggtgt 1920
 ctccctgce ctcttggac agcagagac gactaiccag gataacccc caatgcagg 1980
 gtagccagga gggcagiga cccagccag gctgcagcc gctctgccc agctagagtc 2040
 cagagglica agagcctagg ctgtgtcat accccacca ctgtggcagg gggggagc 2100
 aactttgac ctaccicc amccitgic tccicccac agcccccag cactactgag 2160
 aagtgtcca tgggtgtg agggctacag gaagagccag aagtgggac ctccatggg 2220
 ggcagtggt tgaacccca tctggactc caccctacig atactctgg atgtggggga 2280
 ctgagagag cagcagciga gcttctgga gggggggtc caggtctct gctcttggg 2340
 ctgggccc cnaaccnla tggcccac cctgtgccc agcagccca atactcagc 2400
 cnaaccnag aacataggc tgaattccct tccaccttg ggcgtaccc aggcacacg 2460
 gctctaggt gnaactcag ccagtgtct cpactgmac attaggaac agtgcaagtc 2520
 aagccagac aggggigccc agtggggtc gactccacag gactggccc ctgctcaat 2580
 gccacccca gtaggggccc cccacatca cagctctct tteccatla cccagagcc 2640
 tctctccc aatctctga gtagggccc tatcccagc ccccccga ttactctct 2700
 tcaagacca ggccttgct ggaattgat tcccaccc atccacagc gacgtcaag 2760
 gctcagctg tctgtatla tctcaatt cnaacagagc tctgtggga ggtggggc 2820
 aggaagag cccagccca ggaacilcc taccagagtc ccaagtiat gggagatcc 2880
 caggtiagcc cagccgtgc taagctcca gigaacacat atggactgg cttggagcc 2940
 aacttgcac aatcaagtc aggticctai cccacccctt caccatgcca tgaatctt 3000
 gtagtgggg caatlaggc tccactagg gcagcagac cactcagci tctgcccac 3060
 ttgcccctt gctatggcc tctcaagtg gaggacaca acccagctg tggactct 3120
 gaggigggc gctagggag ggtctctgct ttgtacccc ctccagagc acaggtatgt 3180
 aaccccttg acicctiga tctgacac actcagctgg acttgggac tctctggat 3240
 gacccagc gctgagtc tctctctc catgacagc gggcagctc tggacatac 3300

99

100

ccacccccc cggggcccc caccatggc gggggcaaca tgaatgicct acgagatcc 3360
 ctactgggg aaacagactt cctcaactct agtgcctaaa gagiagggaa tctatccat 3420
 cacagatgc atilccctaa gggtttctat ccttcagaa aaatgggga agtgcagtc 3480
 cctgcacaa gaggccctag ggtatggagg tatgggctgg ggctatgla tagtcigtat 3540
 acgttttag gagaatttg aatagaac tgttctga taataagga acgcatcag 3600

<210> 17

<211> 1046

<212> PRT

<213> Human

<400> 17

Met Phe Asn Ser Met Thr Pro Pro Pro Ile Ser Ser Tyr Gly Glu Pro
 1 5 10 15
 Cys Cys Leu Arg Pro Leu Pro Ser Gln Gly Ala Pro Ser Val Gly Thr
 20 25 30
 Glu Gly Leu Ser Gly Pro Pro Phe Cys His Gln Ala Asn Leu Met Ser
 35 40 45
 Gly Pro His Ser Tyr Gly Pro Ala Arg Glu Thr Asn Ser Cys Thr Glu
 50 55 60
 Gly Pro Leu Phe Ser Ser Pro Arg Ser Ala Val Lys Leu Thr Lys Lys
 65 70 75 80
 Arg Ala Leu Ser Ile Ser Pro Leu Ser Asp Ala Ser Leu Asp Leu Gln
 85 90 95
 Thr Val Ile Arg Thr Ser Pro Ser Ser Leu Val Ala Phe Ile Asn Ser
 100 105 110
 Arg Cys Thr Ser Pro Gly Gly Ser Tyr Gly His Leu Ser Ile Gly Thr
 115 120 125
 Met Ser Pro Ser Leu Gly Phe Pro Ala Gln Met Asn His Gln Lys Gly
 130 135 140

Pro Ser Pro Ser Phe Gly Val Gln Pro Cys Gly Pro His Asp Ser Ala
 145 150 155 160
 Arg Gly Gly Met Ile Pro His Pro Gln Ser Arg Gly Pro Phe Pro Thr
 165 170 175
 Cys Gln Leu Lys Ser Glu Leu Asp Met Leu Val Gly Lys Cys Arg Glu
 180 185 190
 Gln Pro Leu Glu Gly Asp Met Ser Ser Pro Asn Ser Thr Gly Ile Gln
 195 200 205
 Asp Pro Leu Leu Gly Met Leu Asp Gly Arg Glu Asp Leu Glu Arg Glu
 210 215 220
 Glu Lys Arg Glu Pro Glu Ser Val Tyr Gln Thr Asp Cys Arg Trp Asp
 225 230 235 240
 Gly Cys Ser Gln Glu Phe Asp Ser Gln Glu Gln Leu Val His His Ile
 245 250 255
 Asn Ser Glu His Ile His Gly Glu Arg Lys Glu Phe Val Cys His Trp
 260 265 270
 Gly Gly Cys Ser Arg Glu Leu Arg Pro Phe Lys Ala Gln Tyr Met Leu
 275 280 285
 Val Val His Met Arg Arg His Thr Gly Glu Lys Pro His Lys Cys Thr
 290 295 300
 Phe Glu Gly Cys Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Leu Glu Asn Leu Lys Thr

305	310	315	320
His Leu Arg Ser His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Met Cys Glu His Glu			
	325	330	335
Gly Cys Ser Lys Ala Phe Ser Asn Ala Ser Asp Arg Ala Lys His Gln			
	340	345	350
Asn Arg Thr His Ser Asn Glu Lys Pro Tyr Val Cys Lys Leu Pro Gly			
	355	360	365
Cys Thr Lys Arg Tyr Thr Asp Pro Ser Ser Leu Arg Lys His Val Lys			
	370	375	380
Thr Val His Gly Pro Asp Ala His Val Thr Lys Arg His Arg Gly Asp			
	385	390	400
Gly Pro Leu Pro Arg Ala Pro Ser Ile Ser Thr Val Glu Pro Lys Arg			
	405	410	415
Glu Arg Glu Gly Gly Pro Ile Arg Glu Glu Ser Arg Leu Thr Val Pro			
	420	425	430
Glu Gly Ala Met Lys Pro Gln Pro Ser Pro Gly Ala Gln Ser Ser Cys			
	435	440	445
Ser Ser Asp His Ser Pro Ala Gly Ser Ala Ala Asn Thr Asp Ser Gly			
	450	455	460
Val Glu Met Thr Gly Asn Ala Gly Gly Ser Thr Glu Asp Leu Ser Ser			
	465	470	480
Leu Asp Glu Gly Pro Cys Ile Ala Gly Thr Gly Leu Ser Thr Leu Arg			
	485	490	495
Arg Leu Glu Asn Leu Arg Leu Asp Gln Leu His Gln Leu Arg Pro Ile			
	500	505	510
Gly Thr Arg Gly Leu Lys Leu Pro Ser Leu Ser His Thr Gly Thr Thr			
	515	520	525
Val Ser Arg Arg Val Gly Pro Pro Val Ser Leu Glu Arg Arg Ser Ser			
	530	535	540
Ser Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ala Tyr Thr Val Ser Arg Arg Ser Ser			
	545	550	555
Leu Ala Ser Pro Phe Pro Pro Gly Ser Pro Pro Glu Asn Gly Ala Ser			
	565	570	575
Ser Leu Pro Gly Leu Met Pro Ala Gln His Tyr Leu Leu Arg Ala Arg			
	580	585	590
Tyr Ala Ser Ala Arg Gly Gly Gly Thr Ser Pro Thr Ala Ala Ser Ser			
	595	600	605
Leu Asp Arg Ile Gly Gly Leu Pro Met Pro Pro Trp Arg Ser Arg Ala			
	610	615	620
Glu Tyr Pro Gly Tyr Asn Pro Asn Ala Gly Val Thr Arg Arg Ala Ser			
	625	630	635
Asp Pro Ala Gln Ala Ala Asp Arg Pro Ala Pro Ala Arg Val Gln Arg			
	645	650	655
Phe Lys Ser Leu Gly Cys Val His Thr Pro Pro Thr Val Ala Gly Gly			
	660	665	670
Gly Gln Asn Phe Asp Pro Tyr Leu Pro Thr Ser Val Tyr Ser Pro Gln			
	675	680	685
Pro Pro Ser Ile Thr Glu Asn Ala Ala Met Asp Ala Arg Gly Leu Glu			

<210> 18
<211> 3500
<212> DNA
<213> Human

(400) 18

cccagactcc agccctggac cggccatccc gggcccagg cccagacaga gggcccacc 60
 accctactcc gagagccat gttcaactcg atgacccac caccatcag tagctatggc 120
 gagccctgct gtcctggccc cctcccagt caggggccc ccagtgtgg gagagagga 180
 cigtctggcc cggccttcg ccacnagct aacctcatgt cggccccc cagitatggg 240
 ccggccagg agaccacag ctgctccag ggcacactc ttcttctcc ccggagtga 300
 gtaagtiga ccaagagcg ggcactgtc atctacatc tgcggatgc cagctggac 360
 ctgcagacgg ttatccgac ctcacccag tccctgtag ctctatcaa ctgcgatgc 420
 acatctccag gaggtctct cgtctactc tccatggca ccctagccc atctctgga 480
 ttccagccc agatgaata ccaaaaagg cctctgctt ccttgggtt ccagccctgt 540
 ggtcccctg actctggcc gggggggtt atccacatc ctcatccg gggcccctc 600
 ccaacttgc agctgaatc tggctggac atgttggtt gcaagtgcg ggggaaccc 660
 ttgaagggt atctgtcag cccatctcc acagccatc aggtatctt gttgggtgt 720
 ctggtgtgc gggggggtt cggagagag gagaagcgt agcctgact tgggtatga 780
 actgaatgc gttgggtgt ctgcagccg gaattgact cccagagca gctgtgac 840
 cactacaaa gggagccat ccacggggg cggagaggt tctgtgcca ctggggggt 900
 tgcctaggg agctgagcc ctccacccc cagtacatg tgggtgtc caigccaga 960
 cccatggcg agagccacn caagtgcag ttgaagggt cccggagtc atactcgc 1020
 ctgaaaccc tgaagggcc cctgggttt cccaggtgt agagccatc catgtgtga 1080
 cagaggggt gaggtaagg ctccagcat ggcagtgcg ggcacagca ccagatgg 1140
 accatctcc atggaagcc gtagtatgt agctccctg gctgaccca accatctcc 1200
 gactatagt cgttgggaa acatgtcag acagtgcag gtcctgagc ccagtgcg 1260
 aacgggccc gttggggtg cccctgctt cgggacccat ccattctac agtggagcc 1320
 aaggggagg ggaaggggt tccatcagg ggggaagcc gactgactt ggcagaggt 1380
 gcaatgagg cccagccag cctggggcc cagtcatct gacagatga ccactcccg 1440
 gacgggtgt cagccatcc agacgtgtt gggaaatg ctggcaatg aggggggag 1500
 actgaagcc tctcagctt ggaagggga ccttgcatt ctggcactg tctctact 1560
 ctccagccc ttgagacct caggtgtgc cagctatct accctggcc aatggggg 1620
 cgggtctca aactgcacg ctgtccccc acagtaaca ctgttccc ccggtgag 1680
 cccatgctt ccttgaagc cgcagcagc apctccaga gcatccctc tgcctact 1740
 gtcagccgc gctctctct ggcctctct tcccccctg gctccccc agagatgga 1800
 gcatctcc tgcctgctt tatctgccc cagcatctc tcttcgggc agatctgt 1860
 tgcagcagg ggggtgttc ttgcctctt gacatctc gctggatg gataggtgt 1920
 ctccatgc ctcttgag aggtggggt gattatcag gatacacc cagtccgg 1980
 gtcacccga ggcacatga cccagccag gctgcagcc gtcctgctc agctgagtc 2040
 cagaggttca agagctggg ctgttccat acccaccac ctgtggcag gggagagag 2100
 accctgac ctaccctcc accctgttc tactacccc agccccccg catctctg 2160
 atgtgcca tgggtgtat aggtctccg gaagagccc aggttggga ctcatgtgt 2220
 agcagtgtc tgaacccca tatgacttc cccatctc atactctg atgtggga 2280
 cctgaaggg cagcagcag gcttatgga ggaaggttc cagctctct gctctgtg 2340
 cctgttcc cccatctc tggcccacc cctgtccc agcagcttc atctctga 2400
 cccacccag aactatggg tgaatctct tccatctc gctgtacc agccccag 2460
 gctctgggt gaactacg ccagtgtct cgaatgac atctgga agtcaagtc 2520
 aagccagac aggggtccc agtgggtct gctccacg gacgggac ctgctctat 2580
 gctccccc gtagggggt cccatctc cagctctct ttcacata ccccccag 2640
 tctctccc aatctctca gtcagccc talacccag ccccccga ttactctt 2700
 tgaaccca ggcctgctt ggaactgt tccccccc atccacag gacgtcag 2760
 gctcagctt tgtatctt tctcactt caccagag tactgtgga ggtggggg 2820
 aggaaggt ccccgccc ggaactct taccaggt ccaattct ggggggtc 2880
 caggttgcg cagctgtg taagctct ggaagcat atggcctg cttggacc 2940

107

108

aacilgccc atccaaaglc aggttcctat cccacccctt cccatgcca tgaaaattti 3060
 giagtggggg caaaataggc ttaaaatagg gcagcagcac caccatgact tctgcccaca 3060
 ttgccactt gctatgggc tctcaaggis ggcagcaaaa accccagctg tggcatact 3120
 gagtgggca ggcagggagg gggctctgc tigtacctc ctcccgaagg acaggtatgt 3180
 aaccccctg atctcttga tcttgcacac acatgctgg atttgttgc talrtggat 3240
 gagccdcagg ggcagctcc tctctctca catgtcagc ggcgcagctc tggatatac 3300
 cccctccct ctggccccc caaatggct ggggcacaa tgggtgtctt acgagatcc 3360
 ctactgggg aaacacatt cctcaactct agtgcctaaa gactagggaa tctatccat 3420
 cccagatgc atttctaaag ggtttttat cttctcagaa aaattgggg acctgcagtc 3480
 ccctgcacaa gaggccccc ggttgggagg tatgggttg ggctatgta tagtctgtat 3540
 acgttttgg gagnaatttg ataagcac tgttctctga taataagga actgcainag 3600

<210> 19

<211> 1596

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 19

Met	Glu	Ala	Glu	Ala	His	Ser	Ser	Thr	Ala	Thr	Glu	Arg	Lys	Lys	Ala
1			5						10					15	
Glu	Asn	Ser	Ile	Gly	Lys	Cys	Pro	Thr	Arg	Thr	Asp	Val	Ser	Glu	Lys
			20						25					30	
Ala	Val	Ala	Ser	Ser	Thr	Thr	Ser	Asn	Glu	Asp	Glu	Ser	Pro	Gly	Glu
			35					40						45	
Ile	Tyr	His	Arg	Glu	Arg	Arg	Asn	Ala	Ile	Thr	Met	Glu	Pro	Gln	Ser
			50				55				60				
Val	Gln	Gly	Leu	Asn	Lys	Ile	Ser	Glu	Glu	Pro	Ser	Thr	Ser	Ser	Asp
			65			70				75					80
Glu	Arg	Ala	Ser	Leu	Ile	Lys	Lys	Glu	Ile	His	Gly	Ser	Leu	Pro	His
				85					90						95
Leu	Ala	Glu	Pro	Ser	Leu	Pro	Tyr	Arg	Gly	Thr	Val	Phe	Ala	Met	Asp
			100					105						110	
Pro	Arg	Asn	Gly	Tyr	Met	Glu	Pro	His	Tyr	His	Pro	Pro	His	Leu	Phe
			115					120						125	
Pro	Ala	Phe	His	Pro	Pro	Val	Pro	Ile	Asp	Ala	Arg	His	His	Glu	Gly
			130					135						140	
Arg	Tyr	His	Tyr	Asp	Pro	Ser	Pro	Ile	Pro	Pro	Leu	His	Val	Pro	Ser
			145			150				155					160
Ala	Leu	Ser	Ser	Ser	Pro	Thr	Tyr	Pro	Asp	Leu	Pro	Phe	Ile	Arg	Ile
				165					170					175	
Ser	Pro	His	Arg	Asn	Pro	Thr	Ala	Ala	Ser	Glu	Ser	Pro	Phe	Ser	Pro
				180				185						190	
Pro	His	Pro	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Met	Asp	Tyr	Ile	Arg	Ser	Leu	His
			195				200							205	
Cys	Ser	Pro	Ser	Leu	Ser	Met	Ile	Ser	Ala	Ala	Arg	Gly	Leu	Ser	Pro
			210				215							220	
Thr	Asp	Ala	Pro	His	Ala	Gly	Val	Ser	Pro	Ala	Glu	Tyr	Tyr	His	Gln
			225				230							235	
Met	Ala	Leu	Leu	Thr	Gly	Gln	Arg	Ser	Pro	Tyr	Ala	Asp	Ile	Leu	Pro
				245					250					255	
Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Ile	His	Met	Glu	Tyr	Leu	His

109

110

	260		265		270
Ala Met Asp Ser Thr Arg Phe Pro Ser Pro Arg Leu Ser Ala Arg Pro					
	275		280		285
Ser Arg Lys Arg Thr Leu Ser Ile Ser Pro Leu Ser Asp His Ser Phe					
	290		295		300
Asp Leu Gln Thr Met Ile Arg Thr Ser Pro Asn Ser Leu Val Thr Ile					
	305		310		315
Leu Asn Asn Ser Arg Ser Ser Ser Ser Ala Ser Gly Ser Tyr Gly His					
	325		330		335
Leu Ser Ala Ser Ala Ile Ser Pro Ala Leu Ser Phe Thr Tyr Pro Ser					
	340		345		350
Ala Pro Val Ser Leu His Met His Gln Gln Ile Leu Ser Arg Gln Gln					
	355		360		365
Ser Leu Gly Ser Ala Phe Gly His Ser Pro Pro Leu Ile His Pro Ala					
	370		375		380
Pro Thr Phe Pro Thr Gln Arg Pro Ile Pro Gly Ile Pro Thr Val Leu					
	385		390		395
					400
Asp Pro Val Gln Val Ser Ser Gly Pro Ser Gln Ser Ser Gln Ser Lys					
	405		410		415
Pro Thr Ser Glu Ser Ala Val Ser Ser Thr Gly Gly Pro Met His Asn					
	420		425		430
Lys Arg Ser Lys Ile Lys Pro Asp Glu Asp Leu Pro Ser Pro Gly Ser					
	435		440		445
Arg Gly Gln Gln Gln Gln Pro Glu Gly Thr Thr Leu Val Lys Glu Glu					
	450		455		460
Ala Asp Lys Asp Glu Ser Lys Gln Glu Pro Gln Val Ile Tyr Glu Thr					
	465		470		475
Asn Cys His Trp Glu Gly Cys Thr Arg Glu Phe Asp Thr Gln Asp Gln					
	485		490		495
Leu Val His His Ile Asn Asn Asp His Ile His Gly Glu Lys Lys Glu					
	500		505		510
Phe Val Cys Arg Trp Leu Asp Cys Ser Arg Glu Gln Lys Pro Phe Lys					
	515		520		525
Ala Gln Tyr Met Leu Val Val His Met Arg Arg His Thr Gly Glu Lys					
	530		535		540
Pro His Lys Cys Thr Phe Glu Gly Cys Thr Lys Ala Tyr Ser Arg Leu					
	545		550		555
Gln Asn Leu Lys Thr His Leu Arg Ser His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr					
	565		570		575
Val Cys Glu His Glu Gly Cys Asn Lys Ala Phe Ser Asn Ala Ser Asp					
	580		585		590
Arg Ala Lys His Gln Asn Arg Thr His Ser Asn Glu Lys Pro Tyr Val					
	595		600		605
Cys Lys Ile Pro Gly Cys Thr Lys Arg Tyr Thr Asp Pro Ser Ser Leu					
	610		615		620
Arg Lys His Val Lys Thr Val His Gly Pro Glu Ala His Val Thr Lys					
	625		630		635
Lys Gln Arg Gly Asp Met His Pro Arg Pro Pro Pro Arg Asp Ser					
	645		650		655

111

112

Gly Ser His Ser Gln Ser Arg Ser Pro Gly Arg Pro Thr Gln Gly Ala	660	665	670
Phe Gly Gln Gln Lys Glu Leu Ser Asn Thr Thr Ser Lys Arg Glu Glu	675	680	685
Cys Leu Gln Val Lys Thr Val Lys Ala Glu Lys Pro Met Thr Ser Gln	690	695	700
Pro Ser Pro Gly Gly Gln Ser Ser Cys Ser Ser Gln Gln Ser Pro Ile	705	710	715
Ser Asn Tyr Ser Asn Ser Gly Leu Glu Leu Pro Leu Thr Asp Gly Gly	725	730	735
Ser Val Ala Asp Leu Ser Ala Ile Asp Glu Thr Pro Ile Met Asp Ser	740	745	750
Thr Ile Ser Thr Ala Thr Thr Ala Leu Ala Leu Gln Ala Arg Arg Asn	755	760	765
Pro Ala Gly Thr Lys Trp Met Glu His Ile Lys Leu Glu Arg Leu Lys	770	775	780
Gln Val Asn Gly Met Phe Pro Arg Leu Asn Pro Ile Leu Pro Ser Lys	785	790	795
Ala Pro Ala Val Ser Pro Leu Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ser Asn Asn	805	810	815
Asn Tyr Ser Ser Gly Gly Pro Gly Thr Leu Leu Pro Ser Arg Ser Asp	820	825	830
Leu Ser Gly Val Asp Phe Thr Val Leu Asn Thr Leu Asn Arg Arg Asp	835	840	845
Ser Asn Thr Ser Thr Ile Ser Ser Ala Tyr Leu Ser Ser Arg Arg Ser	850	855	860
Ser Gly Ile Ser Pro Cys Phe Ser Ser Arg Arg Ser Ser Gln Ala Ser	865	870	875
Gln Ala Glu Gly Arg Pro Gln Asn Val Ser Val Ala Asp Ser Tyr Asp	885	890	895
Pro Ile Ser Thr Asp Ala Ser Arg Arg Ser Ser Gln Ala Ser Gln Gly	900	905	910
Asp Gly Leu Pro Ser Leu Leu Ser Leu Thr Pro Val Gln Gln Tyr Ala	915	920	925
Leu Lys Ala Lys Tyr Ala Ala Pro Thr Gly Gly Pro Pro Pro Thr Pro	930	935	940
Leu Pro His Met Glu Arg Leu Ser Leu Lys Thr Lys Met Ala Leu Leu	945	950	955
Gly Glu Gly Arg Asp Ser Gly Val Thr Leu Pro Pro Val His Pro Pro	965	970	975
Arg Arg Cys Ser Asp Gly Gly Gly His Thr Tyr Arg Gly Arg His Leu	980	985	990
Met Pro His Asp Ala Leu Ala Asn Ser Val Arg Arg Asp Ser Asp Pro	995	1000	1005
Val Arg Thr Val Ser Gln Asn Met Ser Leu Ala Arg Val Gln Arg Phe	1010	1015	1020
Ser Ser Leu Asn Ser Phe Asn Pro Pro Asn Leu Pro Pro Ser Val Glu	1025	1030	1035
			1040

113

114

Lys Arg Ser Leu Val Leu Gln Asn Tyr Thr Arg Gln Glu Ser Ser Gln
 1045 1050 1055
 Pro Arg Tyr Phe Gln Ala Ser Pro Cys Pro Pro Ser Ile Thr Glu Asn
 1060 1065 1070
 Val Ala Leu Glu Ala Leu Thr Met Asp Ala Asp Ala Asn Leu Asn Asp
 1075 1080 1085
 Gln Asp Leu Leu Pro Asp Asp Val Val Gln Tyr Leu Asn Ser Gln Asn
 1090 1095 1100
 Gln Thr Gly Tyr Gly Gln Gln Leu Gln Ser Gly Ile Ser Glu Asp Ser
 1105 1110 1115 1120
 Lys Val Ala His Gln Pro Gln Asp Leu Asn Leu Ala Gly Leu Pro Asp
 1125 1130 1135
 Ser His Val Gly Gln Glu Tyr Pro Ala Leu Glu Gln Pro Cys Ser Glu
 1140 1145 1150
 Gly Ser Lys Thr Asp Leu Pro Ile Gln Trp Asn Glu Val Ser Ser Gly
 1155 1160 1165

Thr Ser Asp Leu Ser Ser Ser Lys Leu Lys Cys Gly Gln Gln Arg Pro
 1170 1175 1180
 Arg Gln Gln Pro Arg Gly Phe Gly Leu Tyr Asn Asn Met Val Val His
 1185 1190 1195 1200
 Pro His Asn Leu Trp Lys Val Gly Thr Gly Pro Ala Gly Gly Tyr Gln
 1205 1210 1215
 Thr Leu Gly Glu Asn Ser Ser Thr Tyr Asn Gly Pro Gln His Phe Ala
 1220 1225 1230
 Ile His Ser Gly Asp Gly Leu Gly Thr Asn Gly Asn Thr Phe His Glu
 1235 1240 1245
 Gln Pro Phe Lys Thr Gln Gln Tyr Gly Ser Gln Leu Asn Arg Gln Pro
 1250 1255 1260
 Leu Thr Ser Ser Ala Leu Asp His Ala Cys Gly Thr Gly Ile Gln Gly
 1265 1270 1275 1280
 Ser Lys Leu Lys Gly Asn Ser Leu Gln Glu Asn Gly Gly Leu Leu Asp
 1285 1290 1295
 Phe Ser Leu Ser Val Ala Pro Asn Glu Leu Ala Gly Asn Thr Val Asn
 1300 1305 1310
 Gly Met Gln Thr Gln Asp Gln Met Gly Gln Gly Tyr Ile Ala His Gln
 1315 1320 1325

Leu Leu Ser Gly Ser Met Gln His Gln Gly Pro Ser Arg Pro Gly Gln
 1330 1335 1340
 Gln Val Leu Gly Gln Val Gly Ala Thr Ser His Ile Asn Ile Tyr Gln
 1345 1350 1355 1360
 Gly Thr Glu Ser Cys Leu Pro Gly Thr Gln Asp Asn Ser Ser Gln Pro
 1365 1370 1375
 Ser Ser Met Ala Ala Ile Arg Gly Tyr Gln Pro Cys Ala Ser Tyr Gly
 1380 1385 1390
 Gly Asn Arg Arg Gln Ala Met Pro Arg Gly Asn Leu Thr Leu Gln Gln
 1395 1400 1405
 Gly Gln Leu Ser Asp Met Ser Gln Ser Ser Arg Val Asn Ser Ile Lys
 1410 1415 1420

115

116

Met Glu Ala Gln Gly Gln Ser Gln Gln Leu Cys Ser Thr Val Gln Asn
 1425 1430 1435 1440
 Tyr Ser Gly Gln Phe Tyr Asp Gln Thr Met Gly Phe Ser Gln Gln Asp
 1445 1450 1455
 Arg Lys Ala Gly Ser Phe Ser Leu Ser Asp Ala Asn Cys Leu Leu Gln
 1460 1465 1470
 Gly Thr Cys Thr Glu Asn Ser Glu Leu Leu Ser Pro Gly Ala Asn Gln
 1475 1480 1485
 Val Thr Ser Thr Val Asp Ser Phe Glu Ser His Asp Leu Glu Gly Val
 1490 1495 1500
 Gln Ile Asp Phe Asp Ala Ile Ile Asp Asp Gly Asp His Thr Ser Leu
 1505 1510 1515 1520
 Met Ser Gly Ala Leu Ser Pro Ser Ile Ile Gln Asn Leu Ser His Ser
 1525 1530 1535
 Ser Ser Arg Leu Thr Thr Pro Arg Ala Ser Leu Pro Phe Pro Ile Pro
 1540 1545 1550
 Ile His Gly His His Gln His Gly Tyr Arg Gly Tyr Glu Phe Phe Ala
 1555 1560 1565
 Asp Leu Pro Cys Arg Arg Lys Gln Val Pro Cys Ser Tyr Ala Val Gly
 1570 1575 1580
 Gly Arg Gln Gly Gly Pro Gln Thr Gln Arg Leu Lys
 1585 1590 1595

<210> 20

<211> 5113

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 20

ccggcaccag ccacaccag ccgcgcggag cgcacccagg gacagtcag gccacaccag 60
 gtacgcagag tcgcctgac gccgcgcgag gtagctctgt agatttggga cctgacagcc 120
 aaagccgagc ggaattcttt gagaacacag ctgaagtaai ggaagacat tatggagccc 180
 caggcccaaa gctctacggc gactgagagg aagaagctg acaattccat tgggaattgt 240
 cctcagagaa cagatgtcag ccgagaagcc gtggcctcta gtacccttc caatgaggt 300
 gaaagtcctg gacagatcta taccgagag aagaagacg caatcctat gcgcctcag 360
 agtgicaggg gctcacaac aatcagtcag ggcgcctcga cgtctagtga tggagagcc 420
 tccgagttca aagaagagat caatggctc ctacacac cggcgagcc ctctctccat 480
 taccgtggga ctgtgttgc caatgaccc agaatggct acatggagcc tcaatccac 540
 cctctcctc ttctccctg ctctcctct cctgttccaa tggatgcag acaatctag 600
 ggccgttacc atlatgtgc ctctctctt cctccattac agtgtcttc tgccttctt 660
 agtagccaga cgtatccaga ctgccttc attaggtat cccacaccg taatccact 720
 ggcgcctcag agtccccc cagccccca caccctaca tcaacccaa tatggacta 780
 aicgcctcat tgcactgcag cccatccct tccatgctc ctgttgcctg agagctgag 840
 cctacagatg ctcccatgc ttgagtcag cctggtgaat actatccca gatgtctctg 900
 ctgaagggcc aggcagccc ttatgagac atcttccct cagctgccc tctgttgga 960
 ggagcatcc atattggatg ccttcctg ccgtgacaga ccagattcc cagccctagg 1020
 ctgtcagcta gcccagccg aaacgtaga ctgtccat ctgcactgt agactatg 1080
 ttgcacctt agacatgat aagaacatc ctactctt tggttacat ctctcataa 1140
 tccgttagca gctctcagc agtggttcc tatgggac tctggcag tcaatcag 1200
 cctgcatgta gcttccca cccctccgt cctgtgtct ttcacatga tcaacagat 1260
 ctacgcagac agcaagctt aggtccgga ttggagaca gccctccct catccacct 1320
 gctccacat ttccacaca gagaatata cctgggttc agacattct gacccctc 1380

117

118

caggiaagct ctggcccttc tgagictca cagagcaagc ccacaagaga gtctgacag 1440
 agcagacccg gtggccctat gcataafag cggccaaga tcaagcctga tgaagaccic 1500
 ccagacccag ggcacgggga ccagcaggga cagccggaag gaacacccct agtcaggag 1560
 gaggcggaca agatgaag caagcaggag cctgaagta tctacagac aacctgcac 1620
 tgggaagcct gcaccagaga gctgacac ccagatcagc ttgigcaca tatcaatni 1680
 gacacacite atggagaaa gaaggagtc gtgtgcctc gcttgatig ttcacagag 1740
 cagmaccgt icmaggcca gtacatgig gtagtgata tgagagaca cactggggag 1800
 aagctcaca aatgtaatt tgaaggtgt acaaggct artcaagac ggaanuccig 1860
 amacacact tgagatcra cactggagag aagacatac tctgtagca tgaggctc 1920
 aacagagct tctctatg ttcagatcg gccacgacc aacacagac acatccaat 1980
 gagaacccg atgtatgca aatccagc tgcactagc gtacacaga cccagctct 2040
 ctccgggac ccgtagagc tgtagagc cctgagctc atgtacac gaagcagct 2100
 ggggacatgc accctggac tcccccctg agagattcg gcagcctat acagtcagg 2160
 tccctggcc ggcacatca gggagcatt ggtgagaga aggagctgag caaacctac 2220
 tcaagcggg aagagtgct ccaggtagc acgtcagc ctgagagac aatgacatc 2280
 cagcagagc cagggtgca gtctctatc agcagccac agtccccc cagcaactat 2340
 tccacagtg ggtcagct tctctgac gaggaggtg gtatagaga cctcagtg 2400
 atcagtaga cccacatc ggcctgac attccagc caaccacgc ccttgcttg 2460
 cagccaggc gaacccggc agggacaca tggatggag acatcaact tgaagcga 2520
 aacacagta atggatgt tccagactg aacctatc tccctcaca agccctgag 2580
 gctctctc tctagagaa tggcacacg tccacacac actatgctc ggttgggccc 2640
 gggcccctc tccagagag agtgacctc tccaggtag actcagct gctgacaca 2700
 cccacagga gagacagca tccagacac atcagctc cctacatgag cagccgaga 2760
 tctcgggca tctccctg ctctcagc ccaggtcga cagaggtc ccagccaga 2820
 gggagcccc agatgtgag tctgctgac tctcagac cctctcagc agatgctc 2880
 agaggtcga cagagccag ccagggtgac ggcctgccc gctgctcag cctcagcc 2940
 gtccagcgt agccctac ggcacagta gcagctcga caggtgccc accacacac 3000
 cctcagccc acagagag cctgagctg aagacacga tggcctgct aggggaggg 3060
 agggatcgt aggtgctc gctccagc cctcctcct gaagagcag tctgaggg 3120
 ggtcacacat acagagggc tccctgag cctcagtg cctcagcag cagtgtagg 3180
 agagacagc accctgtag gacgtctg gaggatgt cctcagcag ggtcagc 3240
 ttcagcagc tctatgct tctcctcag atctgctc cctcagcag aagcagc 3300
 ttagtgctc acatctac cagcagagc agcagccac cccgtgct cagcagc 3360
 cctcagcct cagcagcag agagatgt gccctgag cctcagcag agatgct 3420
 gtaactga atgagaga cctcagcag gctgagtg tctcagctt acatcagc 3480
 amccacag agtatgga cagtgtag agtgctcct cagagcag cagtgtag 3540
 cctgagcag agcctgga cctcagcag cctcagcag gctcagtg cagtgtag 3600
 ccagctcag agcagccct cctcagcag agtaaacct atctcagc cagtgtag 3660
 gaggcagct cctcagcct tctcagcag tctcagcag tctcagcag tctcagcag 3720
 cctcagcag agcctcag tctcagcag tctcagcag tctcagcag tctcagcag 3780
 cctcagcag tctcagcag tctcagcag tctcagcag tctcagcag tctcagcag 3840
 accacagc gctcagcag cctcagcag cagcagcag atgagcag cagcagcag 3900
 acatctcag agcagcag cctcagcag cagcagcag gctcagcag cagcagcag 3960
 ccacagcct cagcagcct agatcagc tctcagcag gctcagcag gctcagcag 4020
 aagcagcag gctcagcag gctcagcag tctcagcag tctcagcag tctcagcag 4080
 atgagctag cctcagcag agcagcag atcagcag aagcagcag gctcagcag 4140
 tctcagcag atcagcag cagcagcag agcagcag agcagcag cagcagcag 4200
 ccacagcag tctcagcag tctcagcag tctcagcag tctcagcag tctcagcag 4260
 agcagcag cagcagcag gctcagcag agcagcag cagcagcag gctcagcag 4320
 gctcagcag cctcagcag cctcagcag cagcagcag agcagcag gctcagcag 4380

119

120

ctccctctgc accagggaca gctcagtgac atgagtcaga gragcaggat gaccagcnc 4440
 anseaggagg cacagglica gtcacagcag ctctgctctc ccgtgcagaa ttaticcgg 4500
 caglicctatg accannocat gggcttcagt cagcaagaca ggaagctgg ctctgctctc 4560
 ctctcagatg ccaactgctt gctccaaggg aratgcactg aaaaetctga gttactctcc 4620
 ccaggfgcta accaggtaac sagcncagtt gacagctttg agagtcniga catagaaggi 4680
 gtcagattg atttfgatgc calctagat gatggggacc ataccagctt aatgacagg 4740
 gcttigagcc caagttatit tccagacett tcccaragct cctccgtct caccactccg 4800
 cgggcctacc tccctctcc aatccctatc catggggacc acccaatgg ctatcgggga 4860
 taagagttat tgcagactt ccttgcaga agaaagcag ttcctgcag tatgcagta 4920
 gacgttaggc aaggaggacc amaaacaaa agactgaat gacttgggt tttttttt 4980
 ttttaangt ctgigtgtat tttagaatc tcactcacc tgattgggt gtgtctcag 5040
 tctatctct ttaiggcaaa ggactciga aaacctaaq gattctagg gungaaacg 5100
 tcttcattt cag 5113

<210> 21

<211> 1596

<212> PRT

<213> Human

<400> 21

Met Glu Ala Glu Ser His Ser Ser Thr Thr Thr Glu Lys Lys Lys Val
 1 5 10 15
 Glu Asn Ser Ile Val Lys Cys Ser Thr Arg Thr Asp Val Ser Glu Lys
 20 25 30
 Ala Val Ala Ser Ser Thr Thr Ser Asn Glu Asp Glu Ser Pro Gly Gln
 35 40 45
 Thr Tyr His Arg Glu Arg Arg Asn Ala Ile Thr Met Gln Pro Gln Asn
 50 55 60
 Val Gln Gly Leu Ser Lys Val Ser Glu Glu Pro Ser Thr Ser Ser Asp
 65 70 75 80
 Glu Arg Ala Ser Leu Ile Lys Lys Glu Ile His Gly Ser Leu Pro His
 85 90 95
 Val Ala Glu Pro Ser Val Pro Tyr Arg Gly Thr Val Phe Ala Met Asp
 100 105 110
 Pro Arg Asn Gly Tyr Met Glu Pro His Tyr His Pro Pro His Leu Phe
 115 120 125

Pro Ala Phe His Pro Pro Val Pro Ile Asp Ala Arg His His Glu Gly
 130 135 140
 Arg Tyr His Tyr Asp Pro Ser Pro Ile Pro Pro Leu His Met Thr Ser
 145 150 155 160
 Ala Leu Ser Ser Ser Pro Thr Tyr Pro Asp Leu Pro Phe Ile Arg Ile
 165 170 175
 Ser Pro His Arg Asn Pro Ala Ala Ala Ser Glu Ser Pro Phe Ser Pro
 180 185 190
 Pro His Pro Tyr Ile Asn Pro Tyr Met Asp Tyr Ile Arg Ser Leu His
 195 200 205
 Ser Ser Pro Ser Leu Ser Met Ile Ser Ala Thr Arg Gly Leu Ser Pro
 210 215 220
 Thr Asp Ala Pro His Ala Gly Val Ser Pro Ala Glu Tyr Tyr His Glu
 225 230 235 240

121																
Met	Ala	Leu	Leu	Thr	Gly	Gln	Arg	Ser	Pro	Tyr	Ala	Asp	Ile	Ile	Pro	
				245					250					255		
Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Gly	Thr	Gly	Ala	Ile	His	Met	Glu	Tyr	Leu	His	
				260					265					270		
Ala	Met	Asp	Ser	Thr	Arg	Phe	Ser	Ser	Pro	Arg	Leu	Ser	Ala	Arg	Pro	
				275					280					285		
Ser	Arg	Lys	Arg	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Pro	Leu	Ser	Asp	His	Ser	Phe	
				290					295					300		
Asp	Leu	Gln	Thr	Met	Ile	Arg	Thr	Ser	Pro	Asn	Ser	Leu	Val	Thr	Ile	
				305					310					315		
Leu	Asn	Asn	Ser	Arg	Ser	Ser	Ser	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Tyr	Gly	His	
				325					330					335		
Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Ile	Ser	Pro	Ala	Leu	Ser	Phe	Thr	Tyr	Ser	Ser	
				340					345					350		
Ala	Pro	Val	Ser	Leu	His	Met	His	Gln	Gln	Ile	Leu	Ser	Arg	Gln	Gln	
				355					360					365		
Ser	Leu	Gly	Ser	Ala	Phe	Gly	His	Ser	Pro	Pro	Leu	Ile	His	Pro	Ala	
				370					375					380		
Pro	Thr	Phe	Pro	Thr	Gln	Arg	Pro	Ile	Pro	Gly	Ile	Pro	Thr	Val	Leu	
				385					390					395		
Asn	Pro	Val	Gln	Val	Ser	Ser	Gly	Pro	Ser	Glu	Ser	Ser	Gln	Asn	Lys	
				405					410					415		
Pro	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Val	Ser	Ser	Thr	Gly	Asp	Pro	Met	His	Asn	
				420					425					430		
Lys	Arg	Ser	Lys	Ile	Lys	Pro	Asp	Glu	Asp	Leu	Pro	Ser	Pro	Gly	Ala	
				435					440					445		
Arg	Gly	Gln	Gln	Gln	Gln	Pro	Glu	Gly	Thr	Thr	Leu	Val	Lys	Glu	Glu	
				450					455					460		
Gly	Asp	Lys	Asp	Glu	Ser	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Val	Ile	Tyr	Glu	Thr	
				465					470					475		
Asn	Cys	His	Trp	Glu	Gly	Cys	Ala	Arg	Glu	Phe	Asp	Thr	Gln	Glu	Gln	
				485					490					495		
Leu	Val	His	His	Ile	Asn	Asn	Asp	His	Ile	His	Gly	Glu	Lys	Lys	Glu	
				500					505					510		
Phe	Val	Cys	Arg	Trp	Leu	Asp	Cys	Ser	Arg	Glu	Gln	Lys	Pro	Phe	Lys	
				515					520					525		
Ala	Gln	Tyr	Met	Leu	Val	Val	His	Met	Arg	Arg	His	Thr	Gly	Glu	Lys	
				530					535					540		
Pro	His	Lys	Cys	Thr	Phe	Glu	Gly	Cys	Thr	Lys	Ala	Tyr	Ser	Arg	Leu	
				545					550					555		
Glu	Asn	Leu	Lys	Thr	His	Leu	Arg	Ser	His	Thr	Gly	Glu	Lys	Pro	Tyr	
				565					570					575		
Val	Cys	Glu	His	Glu	Gly	Cys	Asn	Lys	Ala	Phe	Ser	Asn	Ala	Ser	Asp	
				580					585					590		
Arg	Ala	Lys	His	Gln	Asn	Arg	Thr	His	Ser	Asn	Glu	Lys	Pro	Tyr	Val	
				595					600					605		
Cys	Lys	Ile	Pro	Gly	Cys	Thr	Lys	Arg	Tyr	Thr	Asp	Pro	Ser	Ser	Leu	
				610					615					62		

123																	
Arg	Lys	His	Val	Lys	Thr	Val	His	Gly	Pro	Glu	Ala	His	Val	Thr	Lys		
625					630					635						640	
Lys	Gln	Arg	Gly	Asp	Ile	His	Pro	Arg	Pro	Pro	Pro	Pro	Arg	Asp	Ser		
				645					650						655		
Gly	Ser	His	Ser	Gln	Ser	Arg	Ser	Pro	Gly	Arg	Pro	Thr	Gln	Gly	Ala		
			660					665					670				
Leu	Gly	Gln	Gln	Gln	Asp	Leu	Ser	Asn	Thr	Thr	Ser	Lys	Arg	Glu	Glu		
		675				680						685					
Cys	Leu	Gln	Val	Lys	Thr	Val	Lys	Ala	Glu	Lys	Pro	Met	Thr	Ser	Gln		
	690					695					700						
Pro	Ser	Pro	Gly	Gly	Gln	Ser	Ser	Cys	Ser	Ser	Gln	Gln	Ser	Pro	Ile		
705					710						715				720		
Ser	Asn	Tyr	Ser	Asn	Ser	Gly	Leu	Glu	Leu	Pro	Leu	Thr	Asp	Gly	Gly		
				725						730					735		
Ser	Ile	Gly	Asp	Leu	Ser	Ala	Ile	Asp	Glu	Thr	Pro	Ile	Met	Asp	Ser		
		740							745					750			
Thr	Ile	Ser	Thr	Ala	Thr	Thr	Ala	Leu	Ala	Leu	Gln	Ala	Arg	Arg	Asn		
		755					760						765				
Pro	Ala	Gly	Thr	Lys	Trp	Met	Glu	His	Val	Lys	Leu	Glu	Arg	Leu	Lys		
						775						780					
Gln	Val	Asn	Gly	Met	Phe	Pro	Arg	Leu	Asn	Pro	Ile	Leu	Pro	Pro	Lys		
785					790						795				800		
Ala	Pro	Ala	Val	Ser	Pro	Leu	Ile	Gly	Asn	Gly	Thr	Gln	Ser	Asn	Asn		
				805						810					815		
Thr	Cys	Ser	Leu	Gly	Gly	Pro	Met	Thr	Leu	Leu	Pro	Gly	Arg	Ser	Asp		
		820						825						830			
Leu	Ser	Gly	Val	Asp	Val	Thr	Met	Leu	Asn	Met	Leu	Asn	Arg	Arg	Asp		
		835					840						845				
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Ile	Ser	Ser	Ala	Tyr	Leu	Ser	Ser	Arg	Arg	Ser		
		850					855					860					
Ser	Gly	Ile	Ser	Pro	Cys	Phe	Ser	Ser	Arg	Arg	Ser	Ser	Glu	Ala	Ser		
865					870						875				880		
Gln	Ala	Glu	Gly	Arg	Pro	Gln	Asn	Val	Ser	Val	Ala	Asp	Ser	Tyr	Asp		
				885						890					895		
Pro	Ile	Ser	Thr	Asp	Ala	Ser	Arg	Arg	Ser	Ser	Glu	Ala	Ser	Gln	Ser		
		900							905					910			
Asp	Gly	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Ala	Gln	Gln	Tyr	Arg		
		915						920					925				
Leu	Lys	Ala	Lys	Tyr	Ala	Ala	Ala	Thr	Gly	Gly	Pro	Pro	Pro	Thr	Pro		
		930					935					940					
Leu	Pro	Asn	Met	Glu	Arg	Met	Ser	Leu	Lys	Thr	Arg	Leu	Ala	Leu	Leu		
945					950						955				960		
Gly	Asp	Ala	Leu	Glu	Pro	Gly	Val	Ala	Leu	Pro	Pro	Val	His	Ala	Pro		
				965					970						975		
Arg	Arg	Cys	Ser	Asp	Gly	Gly	Ala	His	Gly	Tyr	Gly	Arg	Arg	His	Leu		
		980							985					990			
Gln	Pro	His	Asp	Ala	Leu	Gly	His	Gly	Val	Arg	Arg	Ala	Ser	Asp	Pro		
		995					1000						1005				
Val	Arg	Thr	Gly	Ser	Glu	Gly	Leu	Ala	Leu	Pro	Arg	Val	Pro	Arg	Phe		

1010				1015				1020							
Ser	Ser	Leu	Ser	Ser	Cys	Asn	Pro	Pro	Ala	Met	Ala	Thr	Ser	Ala	Glu
1025				1030						1035					1040
Lys	Arg	Ser	Leu	Val	Leu	Gln	Asn	Tyr	Thr	Arg	Pro	Gln	Gly	Gly	Gln
				1045					1050						1055
Ser	Arg	Asn	Phe	His	Ser	Ser	Pro	Cys	Pro	Pro	Ser	Ile	Thr	Glu	Asn
				1060					1065						1070
Val	Thr	Leu	Glu	Ser	Leu	Thr	Met	Asp	Ala	Asp	Ala	Asn	Leu	Asn	Asp
				1075					1080						1085
Glu	Asp	Phe	Leu	Pro	Asp	Asp	Val	Val	Gln	Tyr	Leu	Asn	Ser	Gln	Asn
				1090					1095						1100
Gln	Ala	Gly	Tyr	Gln	Gln	His	Phe	Pro	Ser	Ala	Leu	Pro	Asp	Asp	Ser
				1105											1120
Lys	Val	Pro	His	Gly	Pro	Gly	Asp	Phe	Asp	Ala	Pro	Gly	Leu	Pro	Asp
				1125					1130						1135
Ser	His	Ala	Gly	Gln	Gln	Phe	His	Ala	Leu	Gln	Gln	Pro	Cys	Pro	Glu
				1140					1145						1150
Gly	Ser	Lys	Thr	Asp	Leu	Pro	Ile	Gln	Trp	Asn	Glu	Val	Ser	Ser	Gly
				1155					1160						1165
Ser	Ala	Asp	Leu	Ser	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Cys	Gly	Pro	Arg	Pro	Ala
				1170											1180
Val	Pro	Gln	Thr	Arg	Ala	Phe	Gly	Phe	Cys	Asn	Gly	Met	Val	Val	His
				1185					1190						1200
Pro	Gln	Asn	Pro	Leu	Arg	Ser	Gly	Pro	Ala	Gly	Gly	Tyr	Gln	Thr	Leu
				1205					1210						1215
Gly	Gln	Asn	Ser	Asn	Pro	Tyr	Gly	Gly	Pro	Gln	His	Leu	Met	Leu	His
				1220					1225						1230
Asn	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Gly	Asn	Ala	Phe	His	Gln	Gln	Pro
				1235					1240						1245
Cys	Lys	Ala	Pro	Gln	Tyr	Gly	Asn	Cys	Leu	Asn	Arg	Gln	Pro	Val	Ala
				1250					1255						1260
Pro	Gly	Ala	Leu	Asp	Gly	Ala	Cys	Gly	Ala	Gly	Ile	Gln	Ala	Ser	Lys
				1265					1270						1280
Leu	Lys	Ser	Thr	Pro	Met	Gln	Gly	Ser	Gly	Gly	Gln	Leu	Asn	Phe	Gly
				1285					1290						1295
Leu	Pro	Val	Ala	Pro	Asn	Gln	Ser	Ala	Gly	Ser	Met	Val	Asn	Gly	Met
				1300					1305						1310
Gln	Asn	Gln	Asp	Pro	Val	Gly	Gln	Gly	Tyr	Leu	Ala	His	Gln	Leu	Leu
				1315					1320						1325
Gly	Asp	Ser	Met	Gln	His	Pro	Gly	Ala	Gly	Arg	Pro	Gly	Gln	Gln	Met
				1330					1335						1340
Leu															

127
 1395
 Leu Ser Asp Thr Ser Gln Thr Cys Arg Val Asn Gly Ile Lys Met Glu
 1410
 1415
 Met Lys Gly Gln Pro His Pro Leu Cys Ser Asn Leu Gln Asn Tyr Ser
 1425
 1430
 1435
 1440
 Gly Gln Phe Tyr Asp Gln Thr Val Gly Phe Ser Gln Gln Asp Thr Lys
 1445
 1450
 1455
 Ala Gly Ser Phe Ser Ile Ser Asp Ala Ser Cys Leu Leu Gln Gly Thr
 1460
 1465
 1470
 Ser Ala Lys Asn Ser Gln Leu Leu Ser Pro Gly Ala Asn Gln Val Thr
 1475
 1480
 1485
 Ser Thr Val Asp Ser Leu Asp Ser His Asp Leu Gln Gly Val Gln Ile
 1490
 1495
 1500
 Asp Phe Asp Ala Ile Ile Asp Asp Gly Asp His Ser Ser Leu Met Ser
 1505
 1510
 1515
 1520

Gly Ala Leu Ser Pro Ser Ile Ile Gln Asn Leu Ser His Ser Ser Ser
 1525
 1530
 1535
 Arg Leu Thr Thr Pro Arg Ala Ser Leu Pro Phe Pro Val Ala Val His
 1540
 1545
 1550
 Glu His His Gln His Gly Tyr Arg Gly His Glu Phe Phe Ala Asp Leu
 1555
 1560
 1565
 Pro Ser Gly Arg Lys Gln Ile Pro Cys Ser Tyr Ala Ile Gly Phe Arg
 1570
 1575
 1580
 Lys Lys Arg Leu Gln Pro Thr Glu Ile Asn Arg Ser
 1585
 1590
 1595

<210> 22

<211> 5055

<212> DNA

<213> Human

<400> 22

cgaatacag tggcaattt tggcagaga ggcgtgaagt aatgagaga catcattgag 60
 gaccagtcac acagrtccac gaacacigaa angaannaag ttagaattc catagtgaag 120
 tgcrtacac gaacagaigt ggcgagagaa gcggttgccr ccagacagac ttctantgag 180
 gatgaangtc ctggacagac tlatcacaga gagagagaa agcgaatcc tatgcagcca 240
 cagaatgtcc aggggtccag caaggtccgt gaggaaacct caacatcgag tgcagagagg 300
 acctatiga tcaagaaaga gatccatggg tccctgcac acgtggcgga gccctatgig 360
 ccgtaccgcg ggcagtgigt tgcattggac cccaggaatg gttacatgga gccccatcac 420
 caccctccac atcattccac tgcattccat cctccctgac caattgaigc cagacatcac 480
 gagggccgtt accatcacga tccatcccg attccatcni tgcattgac ttccgctta 540
 tcactagac ctactatcc ggcctgcgc ttctatgga tctctcaca ccggaacccc 600
 gctgtgctt ccaggtccac ctccagccci ccacatccct acatcatcc ctactatgac 660
 tctatcccti ccttgcagag cagcccatcg ctctccatga tctcagcacc ccgtgggtg 720
 agccatcac atgggcccc tgcagggtc agccagcag aatcatatcc tccatgggc 780
 ctctatctg gccagcag cccatgac gaattatc cctcagtcg ccccgccg 840
 accggagcca tccatgga atactatct gctatggata gccacagatt ctccagccc 900
 aggtatrac ccaggccag ccgaaacgt accatgcca tctaccact ctccatcat 960
 agcttgacc ttccagccat gaaaggag tctccacai ccttgcac gattccat 1020
 aatcccgta ggcctcttc agcaatggc tctatggtc actatctgc cagtgcaatc 1080
 agcctgctt tgcctcttc ctactctcc ggcctgcti ctctccat gctcagag 1140

129

130

atcetaagcc gacaaagag cttaggttca gccittggac aagaccctcc actcaccac 1200
 cctgcaccaa ctttccac acagaggcc attcaggga tccctacgt tetgacccc 1260
 gtccaggta gcccgccc ttctagtc tccagaacn agccacag tgagictga 1320
 gtgagrgca ctggtgccc gctgcacaac aagaggtccn agtcaaac ccgaagagc 1380
 ctccacgcc caggggctc gggcagcag gacagccc aaggaacac cttgtccag 1440
 gaggagggg acaagatga agcnaacag ggcctgag tctctatga gacaaactg 1500
 cactggagc gctgcgcag ggcgttcac acccaagc agctgtga ccatataat 1560
 aacgcata ttctggaga gaggaggg ttctgttga ggtggtgga cgtcaga 1620
 gacagaaac cttcaagc ccagiatag ttgtgtgtc atatgagag acanccggc 1680
 gagaagctc acaatgac tttagggg tgcacaaag cctactgag actagaaac 1740
 ttgaanac actigagac tccactgga gagaacac acgtcigtg gcagaggtt 1800
 tgcacagg ctttccaa tgcctcgt agcgcaac accaaacg aacgcttc 1860
 atgagaaac cttatgtg caaatccn ggcgtgac agcttacc agacnaagc 1920
 tccctcgga aacatgtg gacgtggt ggcacagag cttatgtac gaagagcag 1980
 cagagggga tccctctg gctgcaccc cagagagat ccgagagca ttccagtc 2040
 aggtgcctg gccgacgc tccggagcc cttgttgg agcaggaat cagcaacac 2100
 acctaaagc gggagagtg cctccaggt aacacgtc aggcagagaa gccatgac 2160
 tctagccaa gccctgtg tccgttcc tgcagagcc aacagtcac cctcagcnc 2220
 tatccaca gtgggtga gcttcttg accagtgag gtatgtag agacctagt 2280
 gacatgag aaccccaat cctgacac acccttcc ctgcacac agccttgc 2340
 ttgcagcca ggaagaaac ggcagggac aaatggtg agcagtaaa actagaaag 2400
 ctanaaac tgaatgaa gttccgga ctgaaccca ttctacccc taagccct 2460
 ggggtctc cttcctag aaatggcaca cgtcnaac aacatgag cttgggtgg 2520
 cccatgagc ttctcagg cagaagcag cttctaggg tggatgac tatcagac 2580
 atgtcaaa gaggggag cagcagcag accatagc cggctacat gacagcgc 2640
 cgtctcag ggtctgccc ctgttctc agcagccgc ccagagagc gtcacagcc 2700
 gaggccggc cgcagagc ggcgtgccc gctctcag accatctc caccagcc 2760
 tggccgct ccagcagc cagcagagc gacggctg ccagctgct cagctcag 2820
 cccgcagc agtccgct caggcagc tccaggtg ccacagagc gccgcagc 2880
 aagccctg ccaaatgga gagaatgag ctgaagagc gctgggct gctggggat 2940
 gccctagc ctgctggc cttccctc gttcagcc ctgagagc cagagcag 3000
 ggaagccag gtaagggc ggcacatg cagcagcag atgcctgg ccagggctg 3060
 agggggca ggaacggc gggacagc ccagagcc tggcctgca ttgtgtgc 3120
 cgttcagc gctcagag ctgcacccc ccgctgtg ccagctgc ggaagagc 3180
 agtctgtc ttcaaatc cccagccc gaggagcc agtccgaa cttccctg 3240
 tccctgtc ctccagac cccagagc gtcacctg agtccctg cctgagct 3300
 atgcaaac tgaagatg ggtttctc ccgagcag tggtagta tttaattc 3360
 cagaaacag cagggtac ggcacctc ccagcagc cccagagc cagaaagt 3420
 cccagggc cgtgactt gacagccc ggcctgag acagccag tggcagag 3480
 ttctagcc tggagagc ctgcccag ggcagaaa ccagctgc ccttctgg 3540
 aagagatc gctcagag cccagatg tctctcag agtcaagt tgggcagc 3600
 cctgtgtc cgcagctc cgtttggg ttctgaag cctgtgtt cccccagc 3660
 aacccctg gaggagcc tctggggc tctcagcc tggagagaa cagaaaccc 3720
 tctggggc cagagcct gctgtccc aacagccc gaagtggc cgttgaaa 3780
 gccctcat aacagcct taagccccc cgtatggg actgtctc cagagagc 3840
 gtggccct ggcactga cgtgtctg ggtccggg ttcaagctc aagctgag 3900
 agcaaccca tgcagggg cgggggag ctgaattc gctgaggt agcgcacat 3960
 ggtgagct gcagaggt gattggct cagacccg accagtgg acagaggtc 4020
 ctgctacc agtctcag cagagatg cagacccc ggcagagc cccaggtc 4080
 cagatgctt ggcagatg tctactca ccaacaa tcaacagg gcagagagc 4140

1. 環境の持続可能性

* 列を示す図である。

【図1】一文字表記によるマウスG111のアミノ酸配列※

1000
 1000
 1000
 1000

[illegible]

フットボールの歴史

(S1)Int.Cl. ¹	識別記号	F I	7-コード (参考)
A 6 1 P 19/00		A 6 1 P 19/02	4 C 0 8 8
19/02		19/08	4 H 0 4 5
19/08		19/10	
19/10		43/00	1 0 5
43/00	1 0 5	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 5/06		1/68	A
15/09	Z N A	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/02		33/50	Z
1/68		33/53	D
G 0 1 N 33/15			M
33/50		33/566	

33/53
33/565
// C 0 7 K 14/47

C 0 7 K 14/47
A 6 1 K 37/02
C 1 2 N 15/00
S/00
Z N A A
E

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA12 DA13 DA14 DA36
FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA09
CA20 DA02 DA03 EA04 FA02
FA06 GA13 GA18 HA11 HA14
HA17
4B063 QA01 QA05 QA13 QA17 QA19
QQ08 QQ21 QQ41 QQ43 QQ53
QQ61 QQ69 QR08 QR32 QR35
QR40 QR42 QR56 QR62 QR77
QR80 QS16 QS25 QS34 QX02
4B065 AA91X AA91Y AA93X AA93Y
AB01 AC14 AC20 BA02 CA24
CA43 CA44 CA46
4C084 AA02 AA13 AA17 BA01 BA02
BA22 CA17 NA14 ZA96 ZA97
ZB21
4C085 AA01 EA16 MA01 MA04 NA14
ZA96 ZA97 ZB21
4B045 AA10 AA30 BA10 CA40 EA20
EA50 FA74